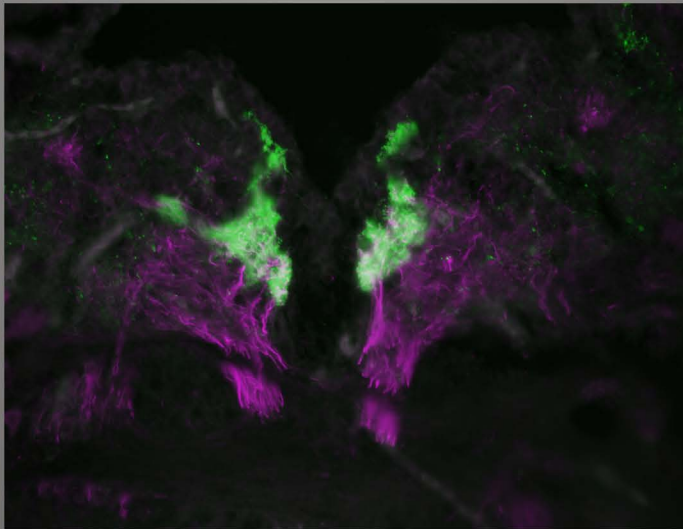




Universidade de A Coruña

Estudio inmunohistoquímico de la distribución del receptor opioide delta (DOR1) en el encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*) y su relación con la Met/Leu encefalina



MIRIAM FERNÁNDEZ VEGA

TESIS DOCTORAL

2015



Universidade da Coruña
Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular
Área de Bioloxía Celular

Estudio inmunohistoquímico de la distribución del receptor opioide delta (DOR1) en el encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*) y su relación con la Met/Leu encefalina.

MEMORIA

Que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta

Dña. Miriam Fernández Vega.

A Coruña, Octubre de 2015



Dña. María Jesús Manso Revilla, Catedrática de Biología Celular en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de la Coruña y D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Contratado Doctor en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña,
INFORMAN

Que la presente memoria titulada “ Estudio inmunohistoquímico del receptor opioide delta (DOR1) en el encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*) y su relación con la Met/Leu encefalina”, presentada por Dña. Miriam Fernández Vega, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña. Considerando que cumple las condiciones exigidas para aspirar al Grado de Doctor en Biología autorizamos su presentación como trabajo de Tesis Doctoral.

Y para que así conste expedimos el presente informe en A Coruña a 8 de Octubre de 2015

Fdo.- María Jesús Manso Revilla

Fdo.- Antonio Manuel Castro Castro

A mis padres

Y llegados a este punto solo me queda agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron en esta etapa de mi vida que está a punto de cerrarse.

A mis Directores María Jesús Manso y Antonio Castro agradecerles la oportunidad que me dieron al permitirme entrar a formar parte de su grupo y enseñarme no solo cosas relacionadas con la investigación si no también cosas de la vida que me ayudaron a crecer como persona.

A mis compañeros de laboratorio Lula, Merce, Iván, Mónica... si me olvido de alguno lo siento, darles las gracias por todos esos momentos inolvidables que pasé a su lado, tanto los buenos como los no tan buenos. Porque va a ser difícil que olvide todos esos momentos de risas que tuvimos, cada momento de agobio y también cada momento de lloros sin ellos creo que aun estaría a estas alturas intentando saber como se saca el saco vitelino de un pez. Gracias a todos por hacer esta etapa tan especial, de todos vosotros aprendí algo.

No sería justo escribir agradecimientos y no mencionarlos a ellos, mis padres. Son sin duda a los que más tengo que agradecer porque sin su apoyo y sin su sacrificio constante a lo largo de toda mi vida no estaría aquí ahora mismo, gracias.

A mis amigos, a los que llevan muchos años en mi vida y a los que hace menos que entraron, que consiguieron muchas veces darle la vuelta a las cosas y convertir momentos en los que me gustaría tirar todo por la borda en momentos de coger impulso y tirar para delante con más ganas.

Y por último aunque no menos importante, a ti, muchas gracias por todos esos momentos en los que me aguantaste, en los que sufriste cada paranoia o cada agobio que se me planteaba escuchándome en silencio y dándome todo tu apoyo, por cada palabra que tuviste de animo y enseñarme que en la vida no todo es blanco o negro si no que existe el gris, muchas gracias porque sin ti esta etapa no hubiese sido igual.

En definitiva muchísimas gracias a todos.

El receptor opioide delta (DOR1) junto con su ligando específico Met/Leu encefalina forman parte del sistema opioide endógeno. Estudios previos han revelado la amplia distribución de DOR en el cerebro de mamíferos así como su implicación en funciones tales como la analgesia, comportamiento sexual, control motor, adicciones, etc. En el pez cebra, se han demostrado mediante hibridación *in situ* los patrones de distribución de los dos receptores delta clonados hasta la fecha. El presente trabajo se ha centrado en el estudio, mediante técnicas inmunohistoquímicas, de la distribución de DOR1 en el encéfalo del pez cebra adulto para así poder detallar los circuitos neuronales de este sistema y ampliar el conocimiento existente sobre la distribución y la implicación de dicho receptor en el sistema nervioso de vertebrados. Nuestros resultados demostraron que existe una amplia distribución del receptor opioide delta en todo el encéfalo del pez cebra, siendo así mismo esta distribución comparada con la observada en otras especies de vertebrados.

O receptor opioide delta (DOR1) xunto co seu ligando específico Met/Leu encefalina forman parte do sistema opioide endógeno. Estudos previos revelaron a ampla distribución de DOR no cerebro de mamíferos así como a súa implicación en funcións tales como a analxesia, comportamento sexual, control motor, adicións, etc. No peixe cebra, demostráronse mediante hibridación *in situ* os patróns de distribución dos dous receptores delta clonados ata a data. O presente traballo centrouse no estudo, mediante técnicas inmunohistoquímicas, da distribución de DOR1 no encéfalo do peixe cebra adulto para así poder detallar os circuítos neuronais deste sistema e ampliar o coñecemento existente sobre a distribución e a implicación do devandito receptor no sistema nervioso de vertebrados. Os nosos resultados demostraron que existe unha ampla distribución do receptor opioide delta en todo o encéfalo do peixe cebra, sendo así mesmo esta distribución comparada coa observada noutras especies de vertebrados.

Resumen

The delta opioid receptor (DOR1) together with its specific ligand Met/Leu-enkephalin are part of the endogenous opioid system. Previous studies have revealed the wide distribution of DOR in the mammalian brain and their involvement in functions such as analgesia, sexual behavior, motor control, addictions... In zebrafish, it has been shown by in situ hybridization the distribution patterns of the two delta receptors cloned to date. This work has focused on the study, using immunohistochemical techniques, DOR1 distribution in the brain of adult zebrafish in order to detail the neural circuitry of the system and expand existing knowledge on the distribution and the involvement of this receptor in the nervous system of vertebrates. Our results showed a broad distribution of delta opioid receptor throughout the zebrafish brain, and this distribution was compared with that observed in other vertebrate species.

<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1. EL PEZ CEBRA	3
1.2 RELACIONES FILOGENÉTICAS	4
1.2 LA FAMILIA DE LOS CIPRÍNIDOS	7
1.3 ANATOMÍA Y CICLO VITAL DEL PEZ CEBRA	10
1.3.1 Anatomía del pez cebra	10
1.3.2 Ciclo vital y desarrollo del pez cebra	10
2. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TELEÓSTEOS	12
2.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TELEÓSTEOS	12
2.2 ENCÉFALO DEL PEZ CEBRA	13
3. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO	29
3.1 EL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR	36
3.2 MET/LEU ENCEFALINA	39
<u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u>	43
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	47
1.OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	47
2. INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA	48
3.WESTERN BLOT	50
4. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES	52
<u>RESULTADOS</u>	55
1. WESTERN BLOT	55
2. DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR, EN EL ENCÉFALO DEL PEZ CEBRA ADULTO.	56
2.1 Roseta olfativa y bulbos olfativos.....	60
2.2 Telencéfalo: hemisferios telencefálicos.....	64
2.3 Región preóptica, hipotálamo y túbulo posterior	70
2.4 Epitálamo.....	78
2.5 Tálamo y pretecho.....	84
2.6 Techo óptico y toro longitudinal	84
2.7 Toro semicircular y tegmento	85
2.8 Cerebelo y válvula cerebelar	89
2.9 Rombencéfalo rostral.....	89
2.10 Región octavolateral	100
2.11 Lóbulos viscerosensoriales , núcleo comisural y área postrema.....	101

ÍNDICE

2.12 Región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal	106
<u>DISCUSIÓN</u>	113
1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	113
2.DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR	114
2.1 Sistema olfativo	114
2.2 Telencéfalo: hemisferios cerebrales.	116
2.3 Región preóptica, hipotálamo y tubérculo posterior.....	118
2.4 Epitálamo	122
2.5 Tálamo y pretálamo.....	124
2.6 Techo óptico, toro longitudinal, toro semicircular y tegmento	125
2.7 Cerebelo y válvula cerebelar	127
2.8 Rombencéfalo rostral.....	128
2.9 Region octavolateral.....	132
2.10 Lóbulos facial, vagal y glosofaríngeo, núcleo comisural y área postrema	133
2.11 Región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal	134
<u>CONCLUSIONES</u>	137
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	141

AD	asta dorsal	EAC	estrato album central
AM	axones de mauthner	ECG	estrato capa granular
AV	asta ventral	Ed	núcleo enteropeduncular dorsal
BO	bulbos olfativos	EM	estrato marginal
CA	comisura anterior	EO	estrato óptico
CAn	comisura <i>ansulata</i>	EPv	estrato periventricular
CB	cerebelo	Ev	núcleo enteropeduncular ventral
CC	cuerpo cerebelar	FLM	fascículo longitudinal medial
Cce	capa celular externa de los bulbos olfativos	FLL	fascículo longitudinal lateral
Cci	capa celular interna de los bulbos olfativos	FR	fascículo retroflexo
Cgl	capa glomerular de los bulbos olfativos	FRIm	formación reticular inferior medial
CG	capa granular	FRS	formación reticular superior
CPj	capa de células de Purkinje	FTL	fascículo telencefálico lateral
CPost	comisura posterior	FTM	fascículo telencefálico medial
Cr	calretinina	GC	gris central
CH	comisura horizontal	GP	glándula pineal
D	área telencefálica dorsal	Ha	habénula
Dc	zona central del área telencefálica dorsal	Had	habénula dorsal
Dd	zona dorsal del área telencefálica dorsal	Hav	habénula ventral
DI	zona lateral del área telencefálica dorsal	Hip	hipotálamo
Dm	zona medial del área telencefálica dorsal	Hipc	hipotálamo caudal
DOR	receptor opioide delta	Hipv	hipotálamo ventral
Dp	zona posterior del área telencefálica dorsal	KOR	receptor opioide Kappa
		LC	<i>locus coeruleus</i>
		LHip	lóbulo hipotalámico posterior
		LV	lóbulo vagal
		ME	médula espinal

Abreviaturas

MO	médula oblongada	PPv	núcleo pretectal
MOR	receptor opioide mu		periventricular
NCC	núcleo comisural de cajal	RLR	región lateral reticular receso
NGS	núcleo gustatorio secundario	RO	preóptico telencéfalo
NI	núcleo del istmo	Tel	tracto de la glándula pineal
NIII	núcleo oculomotor	TGP	tracto gustatorio secundario
NIP	núcleo interpeduncular	TGS	toro lateral
NIPd	núcleo interpeduncular dorsal	TL	tálamo medial
NIPv	núcleo interpeduncular ventral	Tm	techo óptico
NIV	núcleo troclear	TO	tracto olfativo lateral
NM	núcleo medial	Tol	tubérculo posterior
NRa	núcleo del rafe	Tp	toro semicircular
NRad	núcleo del rafe dorsal	TS	válvula cerebelar
NRam	núcleo del rafe medial	VC	zona central del área
NRL	núcleo del receso lateral	Vc	telencéflica ventral
NS	núcleo supraquiasmático		zona dorsal del área
NTl	núcleo lateral del tuber	Vd	telencéflica ventral
NTp	núcleo posterior del tuber		zona posterior del área
NVL	núcleo de la válvula lateral	Vp	telencefálica ventral
OP	órgano periventricular		zona supracomisural del área
PM	núcleo preóptico	Vs	teléncefálica ventral
	magnocelular		zona ventral área
Ppa	núcleo preóptico anterior	Vv	telencefálica ventral.
Ppp	núcleo preóptico		
	parvocelular posterior		



INTRODUCCIÓN

1. EL PEZ CEBRA

Para este trabajo se han utilizado ejemplares adultos de una especie de gran interés en el campo de la neurociencia como es el pez cebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822). Junto con el ratón, el pez cebra es una de las especies animales más usadas en investigación por las numerosas ventajas que presenta. Tales como: gran facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio, rápido desarrollo, que sumado a la transparencia de sus embriones lo convierten en un paradigma ideal para la investigación científica (Mestcher y Ahlberg, 1999). Además de las características mencionadas anteriormente, esta especie puede ser manipulada genéticamente para así obtener “animales a la carta” y ser utilizados en estudios orientados.

Los primeros estudios, en los años setenta, realizados por George Streisinger en el pez cebra, se basaron en obtener embriones haploides o diploides de origen exclusivamente materno, y fueron un punto de partida importante para su posterior uso como organismo modelo. Su uso en investigación aumentó cuando fue posible demostrar que podía ser utilizado para identificar la existencia de nuevos genes mediante cribados mutacionales. Por otro lado, el pez cebra comparte una gran homología genética con otras especies de vertebrados, incluyendo los mamíferos, llegando a compartir con nuestra especie más del 80 % del genoma; lo que permite extrapolar los resultados obtenidos de diferentes estudios a humanos.

Este pez, además, posee la capacidad de regenerar órganos parcialmente amputados, lo que amplía las capacidades de investigación en este campo que tiene como horizonte la recuperación de lesiones medulares. Asimismo, puede considerarse un buen modelo neuroanatómico por sus características filogenéticamente bien conservadas, comunes a muchas especies de peces y presentes en grupos superiores.

4 Introducción

Las características mencionadas anteriormente y que han sido utilizadas para estudiar la biología del desarrollo, se utilizan ahora para descubrir nuevos fármacos y para ampliar conocimientos en el campo de la biotecnología. Por todo esto el pez cebra se ha convertido en un modelo excepcional, no solo en el campo de la biología si no también en biomedicina y en biotecnología (Rojas-Muñoz y col., 2007).

1.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS

El pez cebra pertenece al Género *Danio*, Subfamilia *Danioninae*, Familia *Cyprinidae*, Superfamilia *Cyprinoidea*, Orden *Cypriniformes*, Serie *Otophysi*, Superorden *Ostariophysi*, *Ostarioclupeomorpha* (u *Otocephala*), División *Teleostei*, Subclase *Neopterygii*, Clase *Actinopterygii*, Subgrado *Osteichthyes* o *Euteleostomi*, Grado *Teleostomi*, Superclase *Gnathostomata*, Subphylum *Craniata*, Phylum *Chordata* (Nelson, 2006).

Aparecidos en el Devónico, los peces óseos (*Euteleostomi* u *Osteichthyes*), a diferencia de los peces cartilaginosos (*Chondrichthyes*), se caracterizan por presentar una serie de estructuras osificadas, así como en la mayoría de los casos un órgano hidrostático, la vejiga natatoria o gaseosa. Los Osteictios son un grupo de reciente aparición, y la más rica en cuanto a especies y a individuos; la mayoría de sus especies pertenecen a la clase de los Actinopterigios.

Los Actinopterigios constituyen un grupo monofilético, compartiendo un ancestro común y múltiples características diferenciales, tales como la presencia de radios en las aletas. A diferencia de la mayor parte de los vertebrados en los cuales los hemisferios telencefálicos se

forman por evaginación, en los peces Actinopterigios el telencéfalo dorsal se origina por un proceso de eversión. Los Actinopterigios se agrupan en 3 subclases (Cladistia, Chondrostei y Neopterygii), 44 órdenes, 453 familias, 4.289 géneros y 26.891 especies. Los Neopterygios incluyen 1 división (Teleostei) y 2 órdenes actuales asociados (Amiiformes y Lepisosteiformes).

Los teleósteos son el grupo más numeroso de peces óseos, con alrededor de 26.840 especies, constituyendo los “peces” por excelencia y agrupando la mayoría de las especies que encontramos en nuestros mares, ríos y lagos. Los teleósteos aparecieron a finales del Triásico, hace 220 millones de años, y sufrieron una radiación hace más de 150 millones de años, antes del Mesozoico. Al principio eran peces de pequeño tamaño semejantes a los arenques, con colas simétricas y mandíbulas flexibles (como las de los Neopterygios avanzados). A mediados del Cretácico experimentaron una fase explosiva en su evolución, que dio como resultado la aparición de peces más avanzados como el salmón o la trucha. Se trata de un grupo que ha sufrido una rápida diversificación. A finales del Cretácico/principios de la Era Terciaria se produjo una segunda explosión que fue el origen de los teleósteos que conocemos en la actualidad. Como características diferenciadoras presentan un esqueleto totalmente osificado, radios espinosos en las aletas, cuerpo recubierto por escamas delgadas e imbricadas, branquias protegidas por un opérculo (agallas) y premaxilares móviles. Se distinguen 4 subdivisiones, Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Ostarioclupeomorpha u Otocephala y Euteleostei, que a su vez se subdividen en 40 órdenes, 448 familias y 4.278 géneros. La subdivisión Ostarioclupeomorpha u Otocephala se divide en dos superórdenes, Clupeomorpha y Ostariophysii. El superorden Ostariophysii está formado por 68 familias, 1.075 géneros y 7.931 especies. Los Ostariophysii se subdividen en 5 órdenes, Goniorhynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes y Gymnotiformes, agrupándose los cuatro últimos dentro de la

6 Introducción

serie Otophysi. Dentro de estos, el orden Cypriniforme está formado por 6 familias, 321 géneros y 3.268 especies. Las cuatro familias más extensas de Cypriniformes, Cyprinidae, Characidae, Loricariidae, y Balitoridae, tienen 4.656 especies, el 59% de todos los Ostariophysi, que a su vez representan alrededor del 28% de los peces conocidos en el mundo, y el 68 % de las especies dulceacuícolas. Están presentes en todos los continentes e islas, excepto en la Antártida, Groelandia y Nueva Zelanda.

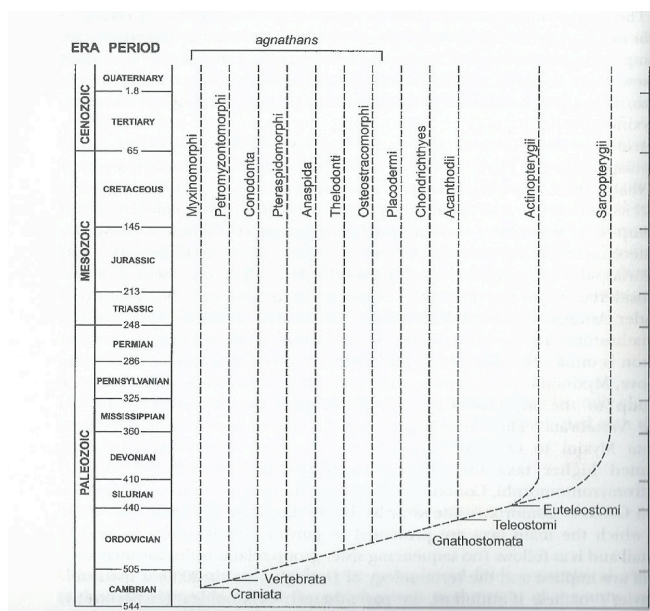


Fig.1. Esquema donde se puede apreciar la relación entre las afinidades y la era geológica en la que aparecieron los mayores grupos de peces (Imagen tomada de Nelson, 2006).

1.2 LA FAMILIA DE LOS CIPRÍNIDOS

La familia Cyprinidae es una familia de peces de agua dulce, con la excepción de la familia Gobiidae. Su distribución abarca América del Norte (desde Canadá hasta el sur de México), África y Eurasia. Esta familia incluye 220 géneros y 2.420 especies. Entre las subfamilias de Cyprinidae se encuentra la subfamilia Rasborinae o Danioninae, que consta de peces africanos y eurasiáticos. En ésta se incluye el género *Danio* y la especie *Danio rerio*. El nombre común para esta familia en América del Norte es “minnow” (pececillo) y en Europa recibe el nombre de Carpa. Varios miembros de la familia Cyprinidae son utilizados como alimento y como animales de experimentación. Las especies más utilizadas en investigación son la carpa común (*Cyprinus carpio*), la carpa dorada (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*).

Los fósiles más antiguos de los ciprínidos pertenecen al Eoceno en Asia, en el norte de América y en Europa datan del Oligoceno. La mayor extinción ocurrió hace 40-38 millones de años en América del Norte, a consecuencia de un marcado enfriamiento global. Posteriormente, a mediados del Oligoceno, hace 30 millones de años, se produjo otro enfriamiento severo en el océano, que parece coincidir con la aparición de los ciprínidos en América del Norte. Si los ciprínidos se originaron en Oriente, la disminución del nivel del mar durante la extinción del oligoceno y la extinción temprana de algunos de sus competidores, pudo haber permitido a los ciprínidos invadir América del Norte a través del puente terrestre de Bering, hace aproximadamente unos 32 millones de años.

8 Introducción

Estos peces poseen dientes faríngeos en 1 a 3 filas, nunca más de 8 dientes por fila. Tienen labios delgados y por lo general no poseen papilas, los barbos pueden estar presentes o no. Por regla general la mandíbula superior está rodeada por un solo premaxilar, siendo normalmente el maxilar superior protrusible. Asimismo, algunos de ellos presentan en su aleta dorsal rayos a modo de espina.

Estos peces se alimentan en diferentes profundidades y según donde se alimenten han desarrollado unas regiones del cerebro más que otras, de ahí que se aprecien diferentes especializaciones dentro de los cerebros de los ciprínidos. Así, la mayoría de las especies que se alimentan en aguas medias presentan sus centros visuales bien desarrollados, mientras que los gustativos y la línea lateral son de tamaño medio. Por el contrario, si se trata de especies detritívoras bentónicas, como es el caso de la carpa común, la tenca y los barbos, los centros gustatorios, el tronco cerebral y el cerebelo alcanzan un gran tamaño, a diferencia de la línea lateral y el centro visual que presentan un tamaño medio. En el caso de la dorada (animal planctívoro) y en general todas aquellas especies que se alimentan en el fondo tienen una línea lateral bien desarrollada, mostrando asimismo los centros visuales y el lóbulo facial un tamaño considerable. Las especies que se alimentan en la superficie, como por ejemplo la carpa común, presentan una formidable línea lateral, pero tienen los lóbulos del tronco encefálico y los lóbulos relacionados con el sentido del gusto poco desarrollados. En el caso de las carpas europeas, que se alimentan en gran medida de una dieta de invertebrados, su sistema visual y los centros gustativos muestran un notable desarrollo. Los centros visuales son mayores en las especies que habitan en aguas claras, mientras que las estructuras olfativas y gustatorias aparecen especialmente desarrolladas en las especies de aguas turbias (Kotrschal y col., 1998).

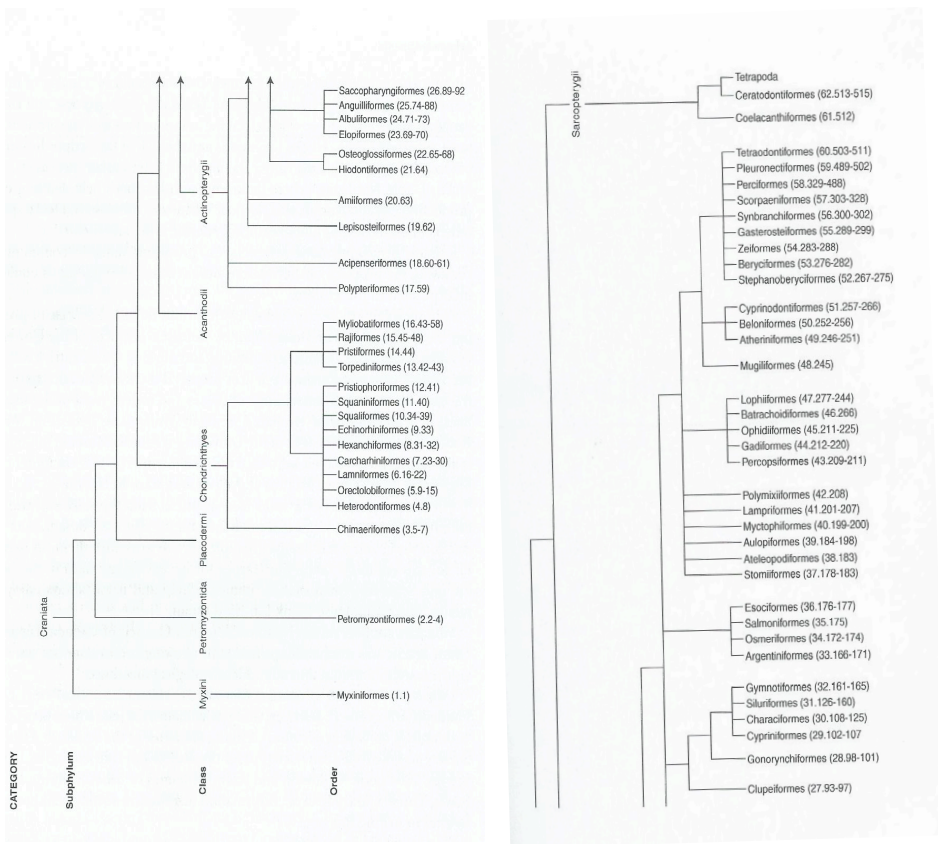


Fig 2. Relación entre la secuencia de clases y órdenes de peces (imagen tomada de Nelson, 2006).

1.3 ANATOMÍA Y CICLO VITAL DEL PEZ CEBRA

1.3.1 Anatomía del pez cebra

El pez cebra es un ciprínido originario del sudeste asiático, emparentado con las carpas y los barbos. Son peces de cuerpo alargado, fusiforme y comprimido, cubierto por escamas cicloides de forma y dimensiones variadas. Presenta una aleta dorsal, la boca dirigida hacia arriba y un par de finos barbillones en la boca, la cual se orienta hacia arriba. El color de base del pez es dorado y presenta 4 líneas o bandas horizontales de color oscuro e intenso que recorren todo el cuerpo



Fig. 3. Imagen del pez cebra (*Danio rerio*) donde se puede apreciar su anatomía externa.

desde el opérculo hasta la cola, apareciendo también en las aletas, a excepción de las pectorales y las ventrales. Los machos de esta especie tienen las aletas más largas y más finas que las hembras, así como un colorido más vistoso. Existe diferencia también en cuanto al tamaño entre hembras y machos, debido a esta diferencia las hembras presentan más curvas en la zona del vientre (Fig.3).

1.3.2 Ciclo vital y desarrollo del pez cebra

Como otros Danios, el pez cebra es omnívoro. Es una especie ovípara, de fertilización externa y puesta libre, ya que esparcen o dispersan sus huevos, los cuales suelen depositarse en el fondo. Desovan periódicamente de 2 a 3 veces por semana; la puesta es muy numerosa, oscilando entre 50 y 300 huevos, cuyo diámetro ronda los 1,2 mm. Precisamente es uno de los animales

más utilizado en el laboratorio por su rápido desarrollo y sus prolíficas puestas. Viven aproximadamente 3 años (a veces llegan a los 5).

En su desarrollo, el pez cebra pasa por diferentes estadios (Fig. 4), los cuales se pueden referenciar a horas (hpf) o días (dpf) de desarrollo tras el momento de la fertilización a 28,5 °C, distinguiéndose:

- Estadio embrionario: entre las 24 y 48 hpf.
- Estadio larvario: entre 72 hpf y 29 dpf.
- Estadio juvenil: entre los 30 dpf y 89 dpf.
- Estadio adulto: entre los 90 dpf y los 3 años.



Fig.4. Imagen donde se representan las diferentes etapas del desarrollo del pez cebra.

2. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TELEÓSTEOS

El sistema nervioso de teleósteos, al igual que el resto de vertebrados, se origina a partir de una invaginación del ectodermo de la región dorsal del embrión (placa neural). Esta invaginación, inducida por la notocorda subyacente, progresa y termina por constituir un tubo, el tubo neural, al fusionarse sus bordes. De esta estructura surgirán, tras unas modificaciones tanto el encéfalo como la médula espinal.

2.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TELEÓSTEOS

El sistema nervioso central de teleósteos está formado por el encéfalo y la médula espinal (Fig.5). El encéfalo de teleósteos, al igual que el de todos los vertebrados, se encuentra dividido en varias vesículas que en sentido rostrocaudal son: el prosencéfalo o cerebro anterior, dividido en telencéfalo y diencéfalo, el mesencéfalo o cerebro medio que apenas sufre ninguna modificación y el rombencéfalo, o cerebro posterior, que está formado a vez por el cerebelo y el bulbo raquídeo.

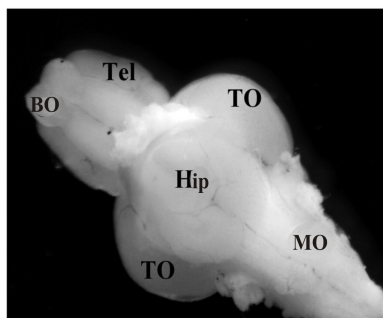


Fig. 5. Imagen, en visión ventral del encéfalo del pez cebra (Imagen tomada de Varga y col., 2011).

Las primeras investigaciones referidas al estudio del desarrollo del encéfalo se centraron en regiones del encéfalo de las que derivan algunos núcleos (Palmgren, 1921; Källen, 1950); con el desarrollo de diferentes técnicas experimentales se produjo un avance en el conocimiento ontogénico del encéfalo al permitir conocer el origen de los distintos núcleos, su diferenciación y sus conexiones a lo largo del desarrollo. Algunas de las

investigaciones se han centrado en la morfogénesis del diencéfalo (Chanchonie y Clairambault, 1975; Corujo y Anadón, 1990), techo óptico (Pinganaud, 1980; Mansour-Robaey y Pinganaud, 1990), cerebelo (Pouwells, 1978) y del sistema hipotálamo-hipofisario en ciprínidos (Plytycz, 1974). Algunos estudios más recientes aportan nuevos datos que permiten avanzar en el estudio de las diferentes regiones del encéfalo; telencéfalo (Wullimann y Mueller, 2004; Folgueira y col., 2012), pretecho y área preóptica (Muller y Wullimann, 2002b), hipotálamo (Rink y Wullimann, 2001), cerebelo (Bae y col., 2009); así como avanzar en el conocimiento sobre las conexiones existentes en el encéfalo; proyecciones desde el hipotálamo hacia regiones rostrales del encéfalo (Rink y Wullimann, 2002b), conexiones del subpallium (Rink y Wullimann, 2004), proyecciones primarias y secundarias en el rombencéfalo (Xue y col., 2006), proyecciones del cerebelo (Folgueira y col., 2006).

2.2 ENCÉFALO DEL PEZ CEBRA

El encéfalo del pez cebra presenta las mismas divisiones del sistema nervioso central del resto de teleósteos: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo (incluye el cerebelo), y mielencéfalo. Las mayores divisiones del cerebro del pez cebra revelan algunas características típicas de ciprinidos, como por ejemplo la presencia de los lóbulos vagal y facial, aunque no sean tan grandes como en otras especies de ciprínidos, como la carpa dorada.

2.2.1 Telencéfalo

El telencéfalo es la parte más rostral del encéfalo. Está formado por los bulbos olfativos y los hemisferios telencefálicos. A diferencia del resto de vertebrados, el telencéfalo de teleosteos se origina por un proceso de eversión (Fig. 6)(Wullmann y Muller, 2004), produciéndose un plegamiento lateral del tubo neural en la región dorsal. Debido a este plegamiento se origina dos hemisferios telencefálicos cubiertos por una membrana endimaria unida a los márgenes dorsales de los hemisferios y teniendo una zona ventricular localizada medialmente.

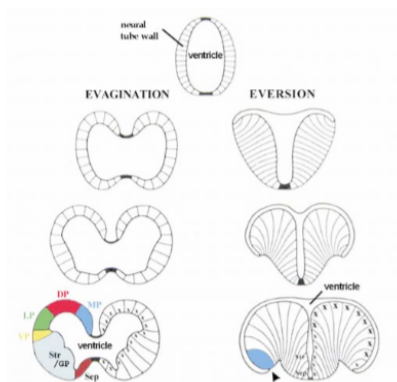


Fig. 6. Esquema de dos modelos de formación del telencéfalo; el de evaginación (mayoría de vertebrados y eversión (Actinopterygios) (imagen tomada de Wullmann, 2009).

Bulbos olfativos

Los bulbos olfativos son unas protrusiones pares dorsoventrales adyacentes al telencéfalo y están interconectados con éste por dos tractos que llevan fibras olfativas secundarias: el tracto olfativo lateral y el tracto olfativo medial. El tracto olfativo lateral entra en la zona dorsal del telencéfalo más rostral mientras el tracto olfativo medial entra dentro del área ventral del telencéfalo. Cada bulbo olfativo está formado por 4 capas, organizadas más o menos concéntricamente (Fuller y Byrd. 2005), y que, desde la periferia hacia el interior, son: la capa de las fibras olfativas primarias (presente solo en los bulbos olfativos rostroventrales), la capa glomerular, la capa de células

externas (incluye las células mitrales, cuyos axones forman los tractos olfativos lateral y medial), y una capa de células internas.

Área ventral telencefálica

Según su ubicación respecto al ventrículo, en el área ventral telencefálica se pueden distinguir varios núcleos: aquellos localizados periventricularmente (núcleo dorsal, núcleo ventral, núcleo supracomisural y núcleo postcomisural) y una serie de núcleos migrados en distinto grado (núcleo central, núcleo lateral, y núcleos entopedunculares dorsal y ventral).

Los núcleos dorsal y ventral están situados rostralmente respecto a la comisura anterior, siendo el núcleo dorsal sustituido caudalmente por el núcleo supracomisural, que a su vez es reemplazado por el núcleo postcomisural (este último ya en posición caudal respecto a la comisura anterior).

Los núcleos migrados central y lateral se localizan en la parte rostral del telencéfalo (rostralmente a la comisura anterior). Mientras el núcleo central está localizado inmediatamente lateral al núcleo dorsal, el núcleo lateral ha migrado a las zonas más periféricas del telencéfalo. Asimismo, se puede apreciar una región de neuropilo entre los núcleos lateral y dorsal. A nivel postcomisural, el núcleo lateral del área ventral es reemplazado por el núcleo entopeduncular (en el cual se pueden distinguir dos porciones: una dorsal y otra ventral). Mientras que las células entopedunculares más rostrales desaparecen, las de la región ventral están localizadas alrededor del fascículo telencefálico lateral, extendiéndose dentro de la región preóptica. El núcleo entopeduncular dorsal puede corresponderse con el núcleo intermedio del área ventral telencefálica de otras especies.

Área dorsal telencefálica

En peces actinoptergios, la región palial se desarrolla por un proceso de eversión, quedando así el epéndimo del ventrículo medial impar situado

16 Introducción

dorsalmente al núcleo dorsal del área ventral telencefálica en la zona medial del área dorsal telencefálica y alcanzando la periferia del telencéfalo. La mayor parte del área dorsal está cubierta por una delgada tela coroidea, que rodea a los ventrículos telencefálicos. A través de la mayor parte de la extensión rostrocaudal del área dorsal se distinguen cuatro masas de células: la zona medial (Dm), dorsal (Dd), lateral (Dl) y posterior (Dp), alrededor de la zona central (Dc). El surco ipsiloniforme separa la zona dorsal de la zona medial. En la zona más rostral, así como en las partes más caudales del telencéfalo del pez cebra, las zonas mediales y laterales del área dorsal se funden sin un límite aparente. Asimismo, Dc, identificada inicialmente por Wullimann y col. (1996) como una zona del palio del pez cebra, no ha podido ser reconocida en esta especie inmunohistoquímicamente (empleando como marcador la parvalbúmina) ni enzimo-histoquímicamente (Mueller y col., 2011).

Tractos telencefálicos y comisuras

La comisura anterior está dividida en una parte dorsal, que discurre inmediatamente ventral al núcleo supracomisural del área ventral telencefálica, y una parte ventral, la cual se apoya en la región preóptica dorsal más rostral. En el telencéfalo precomisural, diversos fascículos convergen rostrocaudalmente y finalmente se unen para formar el fascículo telencefálico lateral. Éste es un tracto compacto localizado lateralmente al fascículo telencefálico medial, extendiéndose ambos tractos dentro del diencefalo. El tracto olfativo medial entra ventralmente en el área telencefálica ventral y cursa caudalmente, lateral al núcleo ventral a nivel de la comisura anterior. El tracto olfativo lateral entra en el área dorsal telencefálica más rostral y discurre lateralmente al borde ventral de la zona posterior del área dorsal telencefálica.

2.2.2 Diencefalo (incluyendo sinencéfalo y pretecho)

En el diencefalo de peces teleósteos se pueden reconocer 5 divisiones, siendo éstas: epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral, tubérculo posterior e hipotálamo. El área preóptica, aunque a menudo considerada parte del hipotálamo, constituye una región intermedia entre el telencéfalo y el diencefalo. El sinencéfalo (región intermedia entre el diencefalo dorsal y el mesencéfalo) así como el pretecho serán tratados en este apartado debido a su íntima relación con el diencefalo.

Área preóptica

En el área preóptica de teleósteos se pueden distinguir una serie de núcleos localizados en las proximidades del receso preóptico del tercer ventrículo: núcleo preóptico parvocelular (más ventral), núcleo preóptico magnocelular (más dorsal) y núcleo supraquiasmático. El núcleo preóptico parvocelular anterior se extiende rostralmente hasta situarse en la parte ventral del telencéfalo caudal. Éste es reemplazado más caudalmente (a nivel diencefálico) por el núcleo preóptico parvocelular posterior el núcleo supraquiasmático está situado ventrolateralmente al núcleo preóptico parvocelular posterior. Dorsalmente al núcleo preóptico parvocelular posterior se sitúa el núcleo preóptico magnocelular, el cual en su zona caudal tiene células preópticas magnocelulares. La parte parvocelular del núcleo preóptico magnocelular tal y como se describe en la carpa dorada (Braford y Northcutt, 1983), no es evidente en el pez cebra.

Epitálamo

En el epitálamo se encuentran el núcleo de la habénula, el cual está formado por el núcleo de la habénula dorsal y el núcleo de la habénula ventral, dos engrosamientos dorsales que se corresponden con la epífisis (órgano pineal) y el saco dorsal. Este último está formado por una tela coroidea, mientras que el órgano pineal, es un órgano endocrino y sensible a la luz.

Tálamo dorsal

El tálamo dorsal emerge por debajo de la parte caudal del núcleo habenular ventral y consiste en un núcleo anterior y dos núcleos situados más caudalmente, el núcleo talámico posterior dorsal y el núcleo talámico posterior central.

Tálamo ventral

El tálamo ventral se localiza ventralmente al tálamo dorsal. La parte rostral del tálamo ventral se dispone justo debajo de la porción rostral del núcleo habenular ventral, alcanzando zonas más rostrales que el tálamo dorsal. El tálamo ventral está formado por un núcleo intermedio, un núcleo ventromedial y un núcleo ventrolateral. El núcleo rostralateral de Butler y Saidel (1991) está también presente en el pez cebra; éste está localizado algo lateral al núcleo talámico ventrolateral y es probable que pertenezca a estos núcleos. Sin embargo Anken y Rahmann (1995) lo identifican como parte del complejo enteropeduncular.

Tubérculo posterior

El tubérculo posterior de teleósteos es una estructura situada en la transición entre el diencéfalo y el mensencéfalo (Folgueira y col. 2005), y al igual que en otros teleósteos, en el pez cebra el tubérculo posterior es mucho más grande que el tálamo dorsal y ventral. En su porción periventricular se pueden distinguir dos núcleos: el núcleo periventricular del tubérculo posterior y el núcleo tuberal posterior, localizados entre el tálamo ventral y el hipotálamo. Los núcleos preglomerulares, caudal, lateral y anterior constituyen los núcleos migrados del tubérculo posterior. El núcleo gustatorio terciario está localizado ventralmente al núcleo preglomerular, habiendo sido malinterpretado como el núcleo glomeruloso visual de otros teleósteos. Ventrolateral al núcleo preglomerular discurre el cuerpo mamilar, que está también incluido en el tubérculo posterior. Así mismo se pueden distinguir

varios núcleos adicionales formando parte del tubérculo posterior: el núcleo talámico posterior, el núcleo subglomerular y el toro lateral.

Hipotálamo

Al igual que en otros teleósteos, el hipotálamo del pez cebra es un área diencefálica que incluye: una zona dorsal, una zona ventral y una zona caudal. Mientras que las partes ventral y caudal constituyen la porción tuberal medial del hipotálamo, la zona dorsal se encuentra adicionalmente expandida lateralmente para formar unos lóbulos pares, los lóbulos hipotalámicos. Estos están separados del hipotálamo tuberal por un profundo surco ventral. Estas tres zonas hipotalámicas contienen masas celulares periventriculares, flanqueadas lateramente por los núcleos migrados. La zona hipotalámica ventral con el núcleo periventricular se extiende rostralmente hacia zonas más alejadas.

El núcleo anterior tuberal y el núcleo hipotalámico lateral se disponen lateralmente a éste. Más caudalmente, la zona hipotalámica, sale y forma el receso ventricular laterocaudal alrededor de la masa de células periventriculares. Probablemente migran desde masas celulares periventriculares que son células pequeñas del núcleo difuso y largas del núcleo central del lóbulo inferior.

La protusión caudal del lóbulo inferior se dispone ventralmente al tegmento e incluye en su zona dorsomedial al cuerpo mamilar. La zona hipotalámica caudal comienza más rostral que el núcleo periventricular, localizándose éste ventralmente con respecto al núcleo posterior tuberal del tubérculo posterior. Más caudalmente, el hipotálamo caudal consiste en un receso posterior ventricular rodeados por el núcleo periventricular. Asociada ventralmente a las zonas caudal y ventral hipotalámicas se encuentra la pituitaria.

Sinencéfalo

El sinencéfalo incluye a una serie de estructuras situadas entre el diencéfalo dorsal y el mesencéfalo. Estas estructuras se localizan en la proximidad de la comisura posterior e incluyen el núcleo del fascículo longitudinal medial, el pretecho periventricular, el núcleo paracomisural y el órgano subcomisural. En el modelo neuroanatómico de Puelles y Rubenstein (1993), el sinencéfalo está en el prosómero más caudal y origina todas las salidas del núcleo pretectal.

Pretecho

El pretecho es una de las regiones más variables del cerebro de teleósteos (Northcutt y Wullimann, 1988; Wullimann y Meyer, 1990; Butler y col., 1991; Wullimann y col., 1991b). Se divide en pretecho periventricular, pretecho central y pretecho superficial (Braford y Northcutt, 1983). La morfología del núcleo pretectal superficial y central en el pez cebra representa claramente la organización pretectal de los teleósteos, en el cual tanto el núcleo cortical como el núcleo glomerular no están presentes. El pretecho superficial incluye los núcleos parvocelular y magnocelular. El núcleo magnocelular se continúa caudalmente con el núcleo pretectal posterior, cuyas células están menos organizadas alrededor del neuropilo central comparado con el núcleo pretectal superficial magnocelular. El núcleo central pretectal se dispone dorsalmente al núcleo magnocelular y al núcleo pretectal posterior. El núcleo pretectal accesorio está situado dorsolateral al núcleo pretectal posterior. Dentro del pretecho se pueden distinguir dos núcleos adicionales: el núcleo óptico accesorio dorsal, situado ventralmente al núcleo magnocelular y al núcleo pretectal posterior, y el núcleo óptico accesorio ventral ubicado más ventromedialmente. En comparación con otros ciprínidos, el núcleo óptico accesorio ventral del pez cebra es más largo.

Tractos diencefálicos y comisuras

En el telencéfalo, los fascículos telencefálicos, lateral y medial se extienden como tractos distintos dentro del diencefalo, el lateral es dorsal al área preglomerular y el medial se aproxima al núcleo tuberal posterior.

En la región ventral del área preóptica anterior, los nervios ópticos se entrecruzan (quiasma óptico) y alcanzan el lado contralateral del encéfalo. Más allá del quiasma, las fibras ópticas, en su conjunto son denominadas tracto óptico, el cual está formado por el tracto óptico dorsomedial y ventrolateral. El dorsomedial corre dorsalmente a lo largo de la cara lateral del preóptico posterior y la región talámica hacia el techo óptico, mientras el tracto óptico ventral cursa caudalmente a lo largo del cuerpo ventral del techo óptico. El tracto pretecto-mamilar se origina en el núcleo pretectal superficial magnocelular y se extiende hasta el núcleo pretectal posterior para terminar en el cuerpo mamilar. El núcleo habenuar proyecta vía fascículo retroflexo hacia el núcleo interpeduncular (Villani y col., 1994) y la comisura habenuar discurre entre los dos núcleos habenuares dorsales. Inmediatamente caudal al quiasma óptico se encuentra la comisura postóptica, la comisura menor y la transversal están incluidas en la comisura postóptica. Ventral a la comisura postóptica, la comisura horizontal entra dentro de la zona hipotalámica ventral. Los tractos que forman la comisura horizontal se sitúan caudalmente de lado a lado del encéfalo y ventrales al área preglomerular. Una tercera comisura está situada caudalmente al núcleo tuberal posterior (Herrick, 1948), esta es la comisura del tubérculo posterior. La comisura posterior está localizada en la región mencionada anteriormente como sinencéfalo.

2.2.3 Mesencéfalo

El mesencéfalo se encuentra situado caudalmente al pretecho y tubérculo posterior. Está formado por el techo óptico, a nivel dorsal, y el tegmento mesencefálico que, junto con el toro semicircular, se disponen ventralmente.

Techo óptico

El techo óptico es la estructura en capas más compleja del cerebro del pez cebra. Está consituido por dos masas ovoideas (denominadas hemitechos), que cubren dorsalmente al ventrículo, unidas medialmente por medio de la comisura intertectal. En el techo óptico se pueden distinguir, 5 estratos, que desde el interior al exterior son: el estrato periventricular, el estrato album central, el estrato de la capa granular, el estrato óptico y el estrato marginal (Castro y col., 2006). Estas pueden ser subdivididas en 15 capas (Northcutt, 1983). A diferencia del resto de vertebrados la capa tectal más superficial de teleósteos no está formada por fibras retinales. El estrato marginal contiene los axones de neuronas localizadas en el toro longitudinal. La comisura intertectal corre entre los hemisferios tectales.

Tegmento

El mesencéfalo ventral se encuentra separado del techo (óptico) por el ventrículo formando el tegmento mesencefálico, el cual tiene un papel importante en el funcionamiento motor.

El tegmento limita rostralmente con el sinencéfalo, el tálamo dorsal y el tubérculo posterior, ventralmente con el hipotálamo y caudalmente el tegmento se continúa con la médula oblongada.

El tegmento incluye algunas estructuras motoras como los núcleos oculomotor, y troclear, el núcleo Edinger-Westphal, el núcleo rojo (*nucleus ruber*) y la porción más rostral de la formación reticular superior.

También forman parte del tegmento mesencefálico de peces de teleósteos los núcleos tegmental rostral y dorsal, el núcleo perilemniscal, el núcleo del

lemnisco lateral y el núcleo interpeduncular (que junto con el núcleo troclear son considerados los núcleos tegmentales más caudales). En ciprínidos, existe una proyección hacia el techo óptico originada en el núcleo tegmental rostral. Por su parte, el núcleo del lemnisco lateral, definido de acuerdo con Prasada y col. (1987), proyecta hacia la médula espinal en la carpa dorada, así como en el pez cebra (Becker y col., 1995).

Toro semicircular

El toro semicircular es una estructura sensorial localizada en el tegmento mesencefálico dorsolateral, protruyendo en el ventrículo tectal. Constituye la diana del sistema octavolateral ascendente, siendo considerado homólogo del colículo inferior de mamíferos. En el toro semicircular de ciprínidos se puede diferenciar claramente un núcleo central, relacionado con la audición, y un núcleo ventrolateral, relacionado con la mecanorrecepción (Echteler, 1984; McCormick y Hernandez, 1996)

2.2.4 Rombencéfalo

El rombencéfalo está dividido en metencéfalo en su parte rostral, y en mielencéfalo, en su parte caudal, lo que viene correspondiéndose con el cerebelo y el bulbo raquídeo, respectivamente.

Cerebelo

Como en todos los teleósteos, el cerebelo del pez cebra consta de tres partes, el lóbulo vestibulolateral (que incluye el lóbulo medial, el lóbulo caudal y la eminencia granular), el cuerpo cerebelar y la valvula cerebelar (Miyamura y Nakayasu, 2001; Wullimann y col., 1996), la cual tiene dos subdivisiones, la medial y la lateral. En el cerebelo de teleósteos, se pueden distinguir diferentes tipos de células, las cuales se pueden clasificar en dos grupos en base a su función excitatoria o inhibidora (Butler y Hodos, 1996; Altman y Bayer, 1997). Las células granulares y las eurodendroides tienen función excitatoria, mientras que las células de Purkinje e interneuronas como las

24 Introducción

células de Golgi son inhibitoras. La comisura cerebelar está localizada dentro del cuerpo ventral entre la válvula y el cuerpo cerebelar. Aunque la válvula se extiende hacia el ventrículo tectal, su histología (presenta la capa granular, la capa molecular y la capa de las células de Purkinje) y el hecho de que este unida caudalmente a la parte rostral de la médula oblongada, no deja lugar a dudas de que forma parte del cerebelo. Mientras el lóbulo vestibulolateral y el cuerpo cerebelar tienen homólogos en otros vertebrados, la válvula cerebelar solo esta presente en peces con aletas rayadas (Nieuwenhuys, 1967; Wullimann y Northcutt, 1988, 1989).

Médula oblongada

La médula oblongada contiene el núcleo motor y sensorial del trigémino, el núcleo abducens y los núcleos facial, octaval, glossofaríngeo y vagal.

En el pez cebra se pueden diferenciar dos núcleos motores trigeminales, uno localizado dorsalmente al fascículo longitudinal lateral y otro situado en el margen ventrolateral del fascículo. Igualmente, se pueden reconocer varios núcleos trigeminales sensoriales: el núcleo trigeminal ístmico primario (caudal al núcleo gustatorio secundario). Núcleo de la raíz del trigémino (situado más caudalmente, en el borde de la raíz mediodorsal trigeminal), el núcleo medial funicular (emerge al final de la médula oblongada) y el núcleo mesencefálico del nervio del trigémino (constituido por neuronas piriformes cuyas fibras sensoriales se sitúan periféricamente en el núcleo trigeminal).

El núcleo abducens consta de dos poblaciones de motoneuronas separadas. El núcleo motor rostral y su raíz están localizados a nivel de la formación reticular superior, mientras que el núcleo motor caudal y su raíz están a nivel de la formación reticular intermedia.

La raíz sensorial del nervio facial entra en el tronco cerebral, cursando hacia la zona medial del mismo, donde gira caudalmente y termina finalmente en el lóbulo facial. Ventral a la raíz sensorial facial, y dorsal a la comisura ventral

rombencefálica y a la formación reticular intermedia, está situado el núcleo facial motor.

Cinco núcleos sensoriales primarios reciben proyecciones desde el núcleo octaval: el anterior, el magnocelular, el descendente, el octaval posterior, y el tangencial.

La raíz del nervio glossofaríngeo entra en el encéfalo, ventralmente al tracto gustatorio secundario. La información gustatoria es procesada en el lóbulo vagal, que es una estructura grande y par, flanqueada por el lóbulo facial. El núcleo comisural de Cajal está situado caudalmente al lóbulo vagal.

Hay dos núcleos relacionados con los nervios de la línea lateral del pez cebra, el núcleo octavolateral medial que está localizado en la parte más rostral del tronco cerebral, arriba del núcleo octaval y está cubierto por la cresta cerebelar y el núcleo octavolateral caudal, que es más pequeño que el medial y está situado lateralmente al lóbulo facial y vagal.

Formación reticular

La formación reticular rombencefálica puede ser dividida en columnas, medial y lateral (Nieuwenhuys y Pouwells, 1983). La formación reticular está situada caudalmente al núcleo interpeduncular, la columna medial incluye el núcleo del rafe superior. El núcleo del rafe inferior se dispone en la región ventromedial del tronco cerebral, a nivel de los lóbulos facial y vagal. La columna medial de la formación reticular incluye el núcleo reticular superior, el núcleo intermedio y el núcleo inferior.

Núcleos medulares adicionales

En la médula oblongada de peces teleósteos se pueden distinguir además una serie de núcleos, tales como: gris central, *locus coeruleus*, núcleo lateral de la válvula, núcleo del istmo, núcleo gustatorio secundario y la oliva inferior.

26 Introducción

El gris central es un núcleo orientado longitudinalmente y situado a lo largo de la línea ventral del ventrículo rombencefálico extendiéndose parcialmente dentro del mesencéfalo.

El locus coeruleus consiste en unas cuantas neuronas de gran tamaño situadas dorsalmente a la formación reticular superior. Esta población neuronal se caracteriza por su naturaleza noradrenérgica en el pez cebra (Ma, 1994 a; b).

El núcleo lateral de la válvula está formado por un grupo de células granulares situadas en el borde ventral del cerebelo. El núcleo tegmental dorsal es a veces considerado parte del núcleo lateral de la válvula, sin embargo sus células están más densamente empaquetadas que en el núcleo de la válvula lateral y se extienden rostralmente dentro del mesencéfalo.

Dos núcleos sensoriales se aprecian en esta zona, el núcleo del istmo, el cual es un núcleo ovoide localizado justo lateralmente al núcleo gustatorio secundario, considerado un núcleo visual, y el núcleo gustatorio secundario, este es un núcleo de gran tamaño situado cerca del núcleo del istmo y del núcleo de la válvula lateral (Castro y col., 2006b). Las células de Mauthner se sitúan en la región rostral octavolateral, entre el núcleo octaval anterior y la comisura ventral rombencefálica.

Los axones de Mauthner están fuertemente mielinizados y descienden en el fascículo longitudinal medial hacia el interior de la médula espinal

La oliva inferior es un núcleo grande de la periferia ventral del tronco cerebral caudal. En teleosteos recibe fibras del cerebelo (Finger, 1983; Wullimann y Northcutt, 1988,1989).

2.2.5 Médula espinal

La médula espinal está formada por, astas dorsales y ventrales de materia gris que son muy visibles alrededor del canal central. Los tractos, situados en la periferia de la sustancia blanca, recorren esta zona longitudinalmente y son comparados en posición y composición con los del tronco cerebral. La

sustancia blanca de la médula espinal puede ser subdividida en dorsal, lateral y un funículo ventral como en la neuroanatomía de mamíferos (Nieuwenhuys y col., 1988).

2.2.6 Tractos espinales/ tronco cerebral y comisuras

A nivel mediotectal, las fibras descendentes del techo óptico forman el tracto tecto-bulbar que discurre ventromedialmente a lo largo de la superficie del toro semicircular y del tegmento. Algunas fibras del tracto tectobulbar cruzan medialmente la comisura ansulata, la cual está localizada inmediatamente rostral al núcleo interpeduncular. Lateral a este núcleo el tracto tecto-bulbar continúa cruzándose caudalmente hacia dentro de la región ventromedial del tronco cerebral.

El fascículo longitudinal medial (FLM) es a menudo considerado como el mayor sistema de fibras descendentes en el cerebro de anamniotas. Se origina en el núcleo del fascículo longitudinal medial y se extiende hacia el final de la medula oblongada (discurriendo inmediatamente ventral al ventrículo rombencefálico). Mientras la parte dorsal del fascículo longitudinal medial (incluyendo los axones de Mauthner) se continúa dentro de la médula espinal, la parte ventral del fascículo longitudinal medial está asociado con otro sistema de fibras en el funículo ventral antes de alcanzar la médula espinal.

El fascículo longitudinal lateral (FLL) es homólogo al lemnisco lateral de mamíferos. El fascículo longitudinal lateral contiene fibras del sistema auditivo y mecanosensorial que se originan en núcleos sensoriales primarios del tronco cerebral y terminan en el toro semicircular. En regiones más caudales, el fascículo longitudinal lateral se encuentra situado dorsalmente a la formación reticular superior, adyacente a la comisura ventral rombencefálica.

28 Introducción

El tracto mesencefálico-cerebelar anterior lleva aferencias cerebelosas desde el pretecho (Wullimann y Northcutt, 1988,1989). Este tracto corre medial al fascículo longitudinal lateral, y gira dorsalmente para atravesar el núcleo lateral de la válvula.

El tracto bulbo-espinal emerge medial a la formación reticular intermedia caudal y discurre caudalmente, creciendo en tamaño, a lo largo del margen medial de la formación reticular inferior.

El tracto vestíbulo-espinal se forma a nivel rostral de la formación reticular inferior, donde se sitúa dorsal a la oliva inferior. Tanto el tracto bulbo espinal como el vestíbulo espinal llevan proyecciones espinales descendientes.

Hay dos comisuras adicionales, la comisura del núcleo gustativo secundario, que discurre entre el núcleo gustatorio secundario, y la comisura ínfima de Haller localizada dorsalemnte al núcleo comisural de Cajal.

3. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO

El sistema opioide fue descubierto en 1973 (Pert y Snyder, 1973; Simon y col., 1973; Terenius, 1973), este sistema está formado por un conjunto de péptidos endógenos y sus correspondientes receptores. Dentro de los receptores opioides, hay tres tipos principales, mu (μ), delta (δ) y kappa (κ), (Brownstein, 1993; Feng y col., 2012, Charbogne y col., 2014), estos tres receptores pertenecen a la superfamilia de las proteínas G acopladas a la membrana (Fig.7) (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992; Chen y col., 1993; Yasuda y col., 1993).

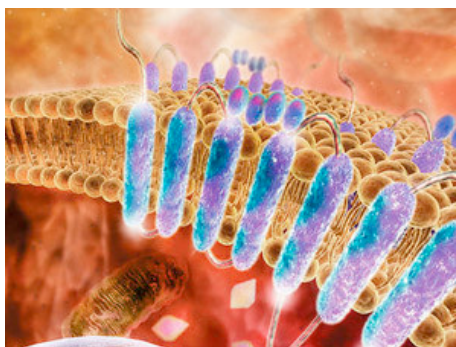


Fig.7. Imagen de la estructura de proteínas G acopladas a membrana (las zonas malvas representan los 7 dominios transmembrana, las zonas anaranjadas representa a la membrana)

Desde su descubrimiento, se han ido clonando los genes que forman parte de los diferentes miembros de la familia de los receptores opioides (Porteros y col., 1999), tres de ellos (MOP, DOP y KOP) han sido clonados en mamíferos, tanto en humanos como en roedores (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992; Charbogne y col., 2014). La clonación de los genes de los diferentes receptores opioides ha proporcionado una buena herramienta para identificar la distribución de sus ARNm en el cerebro mediante hibridación in situ (Mansour y col., 1993, 1994; George y col., 1998), observándose que estos receptores están altamente distribuidos tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico (Fukuda y col., 1993; Mrkusich y col., 2004). La homología existente entre los tres receptores (Fig. 8) sugiere que proceden de un gen ancestral común

30 Introducción

(Rodríguez y col., 2000). La familia de los receptores opioides no sólo ha sido identificada en mamíferos, si no que también se ha identificado en aves, anfibios y peces, incluyendo un mixino sin mandíbula, *Eptatretus stoutii*, el cual es considerado un antiguo linaje que tiene un lugar clave en la evolución de los vertebrados (Li y col., 1996a, b). Diversos estudios sugieren que la familia de los genes de los receptores opioides surgió tempranamente en la evolución de los vertebrados y ha sido altamente conservada a través del tiempo (Barrallo y col., 2000; Darlison y col., 1997).

Los receptores opioides se han clasificado en base a estudios farmacológicos y fisiológicos, farmacológicamente los diferentes subtipos han sido definidos en base

a su habilidad para unirse con sus respectivos ligandos (Harrison y col., 1998). Desde su descubrimiento estos receptores han sido el foco de estudios para conocer su papel como posibles reguladores de neurotransmisores y en adicciones (Peng y col., 2012). Asimismo, se sabe que los receptores opioides juegan un papel importante en el control del dolor (Pradhan y col., 2011; Lutz y Kieffer, 2012; Erbs y col., 2012, 2014) y en procesos homeostáticos. El receptor mu (μ) es el más conocido de todos los receptores opioides, su ligando específico es la morfina, (Yasuda y col., 1993) y media en procesos de analgesia. Mientras que el receptor opioide delta (δ), DOR, ha sido el menos estudiado y actúa sobre el dolor crónico, la inflamación y la ansiedad. El

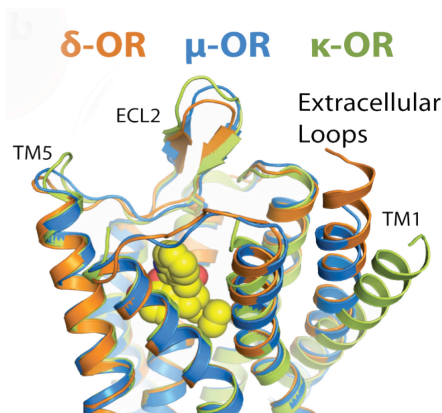


Fig.8. Estructura de los tres receptores opioides Mu, Delta y kappa. Donde se puede apreciar la homología existente entre sus estructuras (imagen tomada de Granier y col., 2012).

ligando específico de DOR es la Met/Leu encefalina (Chadzinska y col., 2009), mientras que el receptor específico para KOR es la dinorfina (Przewlocki y Przewlocka, 2005). Los tres receptores opioides actúan inhibiendo actividad neuronal, así como identificando señales de las vías que controlan la psicología y el comportamiento (Pradhan y col., 2012). Se han realizado estudios que comprobaron que si los receptores opioides son estimulados de manera intensa, durante situaciones de dolor permanente, estos responden reduciendo el dolor (Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 2011). Cambios en la función o en el número de los receptores endógenos dentro del encéfalo, pueden provocar enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas, incluyendo el parkinson, Huntington, esquizofrenia y alzheimer (Gulya, 1990; Gabilondo y col., 1995; Smith y col., 1999).

Como ya se menciono anteriormente el sistema opioide, además de estar formado por estos tres receptores, tiene también unos ligandos endógenos específicos para cada receptor. Estos ligandos son péptidos endógenos, que derivan de cuatro precursores polipeptídicos: proopiomelanocortina (POMC), proencefalina (PENK), prodynorfina (PDYN) y pronociceptina (PNOC) (Noda y col., 1982; Gubler y col., 1982). Los opioides son ligandos endógenos que están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados y la activación de estos ligandos está implicada en procesos de analgesia y recompensa y/o satisfacción (placer). Se cree que los efectos antinociceptivos de los péptidos opioides tienen lugar a través de diferentes vías dentro del sistema nervioso central (Millan, 1986).

Los receptores y sus péptidos opioides endógenos juegan un papel importante en un amplio rango de funciones y comportamientos como la percepción sensorial (particularmente la nocicepción), reforzamiento y recompensa, regulación neuroendocrina, control motor, aprendizaje y

memoria (Pasternak, 1993; Minami y col., 1995; George y col., 1998). A su vez también se ocupan de regular el estrés y alguna de las funciones fisiológicas periféricas como son la respiración, funciones gastrointestinales y procesos inmunes (Pradhan y col., 2011). Datos morfológicos y psicológicos sugieren que los efectos de los opioides endógenos y sus receptores opioides están implicados en la regulación de sistemas monoaminérgicos, en particular el serotoninérgico y el sistema monoaminérgico (Arvidsson y col., 1995). Algunos componentes del sistema opioide afectan a varios aspectos del sistema inmune incluyendo la producción de anticuerpos, respuestas de células T, actividad de células asesinas (macrófagos y granulocitos) (Sibinga y Goldstein, 1998; Rouveix, 1992; Alicea y col., 1998; Sharp y col., 2000). Estudios realizados en anfibios y peces muestran que el sistema opioide está implicado en la nocicepción en estas especies (Stevens, 2004; Sneddon, 2004).

La protección que inducen los opioides podría ser inhibida por antagonistas DOR, pero no con antagonistas de MOR y KOR. Esto sugiere que el sistema opioide está implicado en la neuroprotección de eventos de hipoxia e isquemia. Un aumento de la densidad de DOR en el encéfalo fomenta la resistencia para hacer frente a procesos de hipoxia/isquemia, esto implica una cercana participación de este receptor en la neuroprotección (Narita y col., 2006). Por tanto, podemos decir que parece existir una conexión entre la activación de DOR y la neuroprotección (Staples y col., 2013). Otros estudios sugieren los receptores opioides y sus ligandos endógenos participan también en procesos de diferenciación y proliferación celular (Cheng y col., 2008).

Se han realizado diferentes estudios para caracterizar el sistema opioide endógeno del pez cebra (Barallo y col., 1998, 2000; González-Núñez y col., 2003a, b, c, 2007; Álvarez y col., 2006; Pinal-Seoane y col., 2006; Marrón Fdez de Velasco y col., 2009). Los receptores opioides endógenos del pez cebra y

los precursores péptidicos tienen una alta homología con humanos (Wang y col., 1994; Knapp y col., 1994; Simonin y col., 1994), y rata (Thompson y col., 1993; Meng y col., 1993; Abood y col., 1994). Sin embargo los perfiles farmacológicos de este sistema presentan ciertas diferencias funcionales en el pez cebra comparandolo con mamíferos (Raynor y col., 1994; Rodríguez y col., 2000; González-Núñez y col., 2006). Interacciones existentes entre los receptores pueden estar implicadas no sólo en la embriogénesis, si no también en el desarrollo del sistema nociceptivo de adultos.

Dentro del sistema opioide del pez cebra se han clonado cuatro receptores opioides endógenos:

- El receptor opioide delta, DOR1 (ZfDOR1) (llamado anteriormente ZFOR1) (Barrallo y col., 1998; Pinal-Seonane y col., 2006; Macho Sanchez-Simon, y Rodríguez, 2008) (GenBank accession No.: NC_007130.2): está ampliamente distribuido por todo el sistema nervioso central del pez cebra (Porteros y col., 1999). Este receptor presenta una alta similitud con el receptor opioide delta de mamíferos, concretamente, un 60 % de homología con dicho receptor, estando aproximadamente dos de los tres residuos en los dominos transmembrana altamente conservados entre ellos (McFayden y col., 2001). Aun así diversos estudios realizados para conocer los sitios de unión de los receptores opioides, demostraron que existen diferencias entre el ZfDOR1 y los receptores opoides de mamíferos, lo cual dificulta clasificar a ZfDOR1 como uno de los tipos de receptores opioides clásicos de mamíferos (Rodríguez y col., 2000). Estudios en anfibios han demostrado que el receptor opioide delta presenta una alta homología, un 77%, con el receptor opioide delta del pez cebra (Stevens, 2004).

34 Introducción

- DOR2, ZfDOR2 (llamado anteriormente ZFOR4) (Barrallo y col., 1998; Pinal-Seoane y col., 2006; Macho Sanchez-Simon y Rodríguez, 2008)(GenBank accession No.: NM_212755): muestra también una alta similitud con otros receptores delta.
- El receptor μ homólogo a MOR, ZfMOR (previamente llamado ZFOR2) (Barrallo y col., 2000; Macho Sanchez-Simon y Rodríguez, 2008) (Genbank accession No.:NM_131707).
- El receptor KOR, ZfKOR (previamente ZFOR3)(Álvarez y col., 2006; Macho Sanchez-Simon y Rodríguez, 2008) (Genbank accession No.: NM_182886): Este receptor presenta un 70 % de homología con el receptor Kappa de mamíferos .

En general los patrones de expresión son similares, pero se observaron diferencias en cuanto al número de neuronas que expresan DOR1 y DOR2 en las diferentes regiones del encéfalo.

Nombre/Gen	Descripción	Otros nombres	Nº acceso al GenBank
DOR1	Receptor opioide delta 1a	ZFO1; ZfDOR1, oprd1	NC_007130.2
DOR2	Receptor opioide delta 1b	DOR2;ZfDOR2; ZFOR4; or4	NM_212755
MOR	Receptor opioide Mu	ZFOR2; or2	NM_131707
KOR	Receptor opioide kappa1	ZfKOR; ZFOR3	NM_182886

Tabla 1. Correspondencia de las diferentes denominaciones que han recibido los receptores opioides en el pez cebra (Datos sacados del Genbank, consulta 15 septiembre, 2015).

Los peptidos endógenos actúan a través de sus receptores específicos para inducir muchos efectos fisiológicos como la analgesia, depresión respiratoria, alimentación, la liberación de ciertas hormonas, mejora del humor (Wood y col., 1988). La caracterización de los receptores opioides en el pez cebra permite caracterizar, examinar sus ligandos endógenos, y realizar la clonación de los precursores de los opioides. Los péptidos opioides derivan de cuatro precursores (González- Núñez y col., 2003a, b, 2006, 2007; Bojnik y col., 2014): proencefalina, proopiomelanocortina, prodinorfina, y pronociceptina.

36 Introducción

Los péptidos opioides son codificados por precursores que pueden ser clasificados como: 1. Péptidos que están presentes tanto en el pez cebra como en mamíferos; 2. Péptidos de pez cebra con homólogos en mamíferos y 3. Nuevas secuencias de péptidos específicas de pez cebra.

3.1 EL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR

El receptor opioide delta endógeno, DOR (Fig.9), fue el primer receptor perteneciente al grupo de los receptores opioides en ser clonado (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992), seguido después de la clonación de MOR y KOR (Rossi y col., 1997). Para realizar la clonación original del receptor opioide delta usaron la línea celular, NG108-15, realizaron un híbrido con neuroblastoma de ratón y glioma de rata, este híbrido expresó altos niveles de receptor opioide delta pero no de otros receptores opioides (Harrisson y col., 1998). La estructura del receptor opioide es GPRC

(receptor de membrana acoplado a proteína G) que presenta 7 vueltas de hélice transmembrana y muestra una estructura similar a la del resto de receptores opioides incluso en regiones con baja secuencia de conservación (Granier y col., 2012). Se ha considerado que el ligando específico de DOR es la encefalina, la cual presenta una fuerte interacción con el receptor.

Estudios sobre el receptor opioide delta, DOR, en humanos, indicaron que está ampliamente expresado en el sistema nervioso central, estando en regiones corticales y estructuras límbicas como el hipocampo, la amígdala y también en

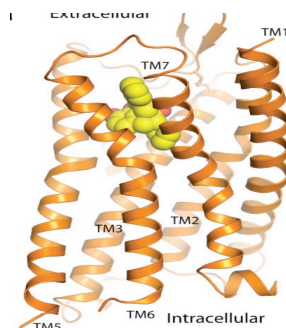


Fig. 9. Imagen de la estructura del receptor delta opioide, mostrando los 7 dominios transmembrana comunes a otras proteínas GPCRs (imagen tomada de Granier y col., 2012).

el ganglio basal (Simonin y col., 1994; Peckys y Landwerhrmeyer, 1999; Smith y col., 1999; Peng y col., 2012).

DOR es un receptor que se une a inhibidores que regulan la transmisión del dolor, debido a esto, en la década pasada el receptor opioide delta se convirtió en un objetivo bastante atractivo para realizar estudios sobre la reducción del dolor crónico (Pradhan y col., 2011; Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 2011). Estudios recientes demostraron que la nocicepción mecánica es principalmente mediada por DOR (Milan-Lobo y col., 2013). A su vez, DOR, contribuye a la modulación de la acción de neurotransmisores y péptidos opioides endógenos y quizá juegue un papel destacado en el reforzamiento opioide. La localización en sinapsis excitatorias asimétricas sugiere que DOR puede estar asociado específicamente con proteínas constituyentes de canales de iones o proteínas ligantes de calcio (Svingos y col., 1995).

El receptor delta opioide, está implicado en diferentes procesos entre los que destacan:

- El control de los procesos emocionales: diversos estudios genéticos revelan un papel de DOR en procesos emocionales (Chung y Kieffer, 2013). El sistema DOR/ encefalinas controla los comportamientos relacionados con la ansiedad. El receptor DOR funciona en áreas de ansiedad y depresión (Filliol y col., 2001). Estudios farmacológicos usando tanto agonistas como antagonistas delta en roedores confirma la mediación de la actividad ansiolítica usando DOR.
- Recompensa y adicción (Chung y Kieffer, 2013): el abuso de drogas activa en el cerebro el sistema de recompensa y produce inicialmente efectos de placer, satisfacción.

- Comportamientos epilépticos (Chung y Kieffer, 2013).
- El control motor (Chung y Kieffer, 2013): el receptor DOR tiene una alta expresión en el estriado. Y está implicado en regulación de la actividad motora y debido a esta faceta la función de DOR está implicado en desordenes del deterioro del control del movimiento como en la enfermedad del Parkinson.
- En hipoxia/ isquemia (Chung y Kieffer, 2013; Chen y col., 2014).
- Su implicación con la memoria espacial (Robles y col., 2003).
- Regulación de la producción de neuropéptidos (Bao y col., 2003).
- Existe relación entre el receptor opioide delta y un descenso en la motivación de la alimentación (Chung y col., 2015).

DOR1	1	mepsvipgad ipdlysinpf nvtfpddvls fvpdgrnyte pnpvkspagi iiaisitaly
	61	svicvvgllg nilvmgyvvr ytklktatni yifnlalada latstlpfq tkylmntwpf
	121	gelckvvia idyynmftsi ftlmmsvdr yiaavchpvr lefrtpikak iinvciwils
	181	savgvpimim avtrvtnqnt tvcmkfpdp dwywdvtki cvfifavvp vlviticygl
	241	milrlksvrl lsgskekrn mrritrmvlv vvaafiicwt pihifiivkt lvdinqknpf
	301	viaswhlcia lgytnsslnp vlyafldenf krcfrdfclp frtradqsnl nrarnatrep
	361	vsvcapsdtg kkpvr
DOR2	1	mepptvtvsd fseryplflh nssfleepag llsnwsggss elkavrgssa vaiavsital
	61	ysvicvvglv gnvlvmygvv rytkmktatni iyifnlalad alatstlpfq sakylmgtwp
	121	fgelckvvi aidyynmfts iftlmmsvd ryiaavchpvr aldfrtpvka kiinvcwil
	181	ssavgfpvmv mavtkeldsg kticmlkfpd pewywdvtk icvfifavf pvlvitvcyg
	241	lmilrlksvr llsgskekrn nlrirtrmvl vvaafiicw tpihifiivk tvveidqknl
	301	lvvacwhlci algyrnssln pvlyaflden fkrcrefcl pfrtrieqns fskarsvire
	361	pisvcakses ikqpt

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos correspondientes a DOR1 y DOR2, donde se pueden apreciar en rojo las diferencias entre ambas (datos sacados de www.ncbi.nlm.nih.gov (consulta 15 de septiembre, 2015))

3.2 MET/LEU ENCEFALINA

Los péptidos opioides fueron aislados a partir de extractos del cerebro del cerdo por primera vez en 1975, entre los primeros péptidos en ser identificados en el sistema nervioso central se incluyen, las encefalinas (Hughes y col., 1975), las dinorfinas (Goldstein y col., 1979) y las β -endorfinas (Bradbury y col., 1975). Las encefalinas son los ligandos endógenos del receptor opioide delta. La proencefalina (Comby col., 1982; Noda y col., 1982), junto con la pro-opiomelanocortina y la prolinoirfina son las proteínas precursoras de los péptidos opioides endógenos. La preproencefalina (PPE) contiene 4 copias de Met-encefalina y 1 copia de Leu encefalina y 2 C-terminales (Proteau-Gagné y col. 2010). La presencia de las 4 Met-encefalinas parece ser universal para todos los vertebrados, pero presenta alguna variación filogenética substancial con respecto a la Leu- encefalina. El precursor proencefalina, es un gen que está altamente conservado en el grupo

40 Introducción

de los vertebrados (Dores y col., 2002; Singh y Rai, 2009), ha sido clonado y caracterizado en grupos de vertebrados tales como mamíferos, anfibios y en los peces pulmonados). La PPE está asociada con rutas nociceptivas en el encéfalo de mamíferos, sin embargo esta proteína no sólo se encuentra en zonas vinculadas con la nocicepción, si no que está ampliamente distribuida en regiones que no están vinculadas con esta función (Vecino y col., 1995).

Los genes que participan en la formación de los ligandos endógenos se originan por duplicaciones en el antecesor común de tetrapodos y de peces (Dores y col., 2002). En peces la presencia de encefalinas ha sido demostrada mediante HPLC y por radioinmunoensayo (King y Millar, 1980; Dores y col., 1989, McDonald y Dores, 1991; McDonald y col., 1991).

Las encefalinas son hormonas peptídicas producidas por el sistema endocrino, incluyendo principalmente a la Met-enkefalina (Fig. 10) y a la Leu-enkefalina (Fig. 11), siendo miembros de la familia de los neuropéptidos opioides. Estos son ligandos endógenos de los receptores opioides, concretamente del receptor opioide delta, y constituyen una parte importante del control de los mecanismos del dolor en mamíferos. A su vez participan también en otros procesos fisiológicos, como por ejemplo el sistema inmune o el neuroendocrino.

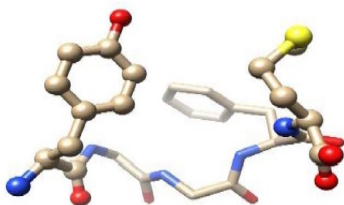


Fig. 10. Modelo estructural de la Met/Leu encefalina (imagen tomada de Bergès y col., 2015).



Fig.11. Representación de la estructura de la Leu encefalina imagen tomada de Granier y col., 2012).

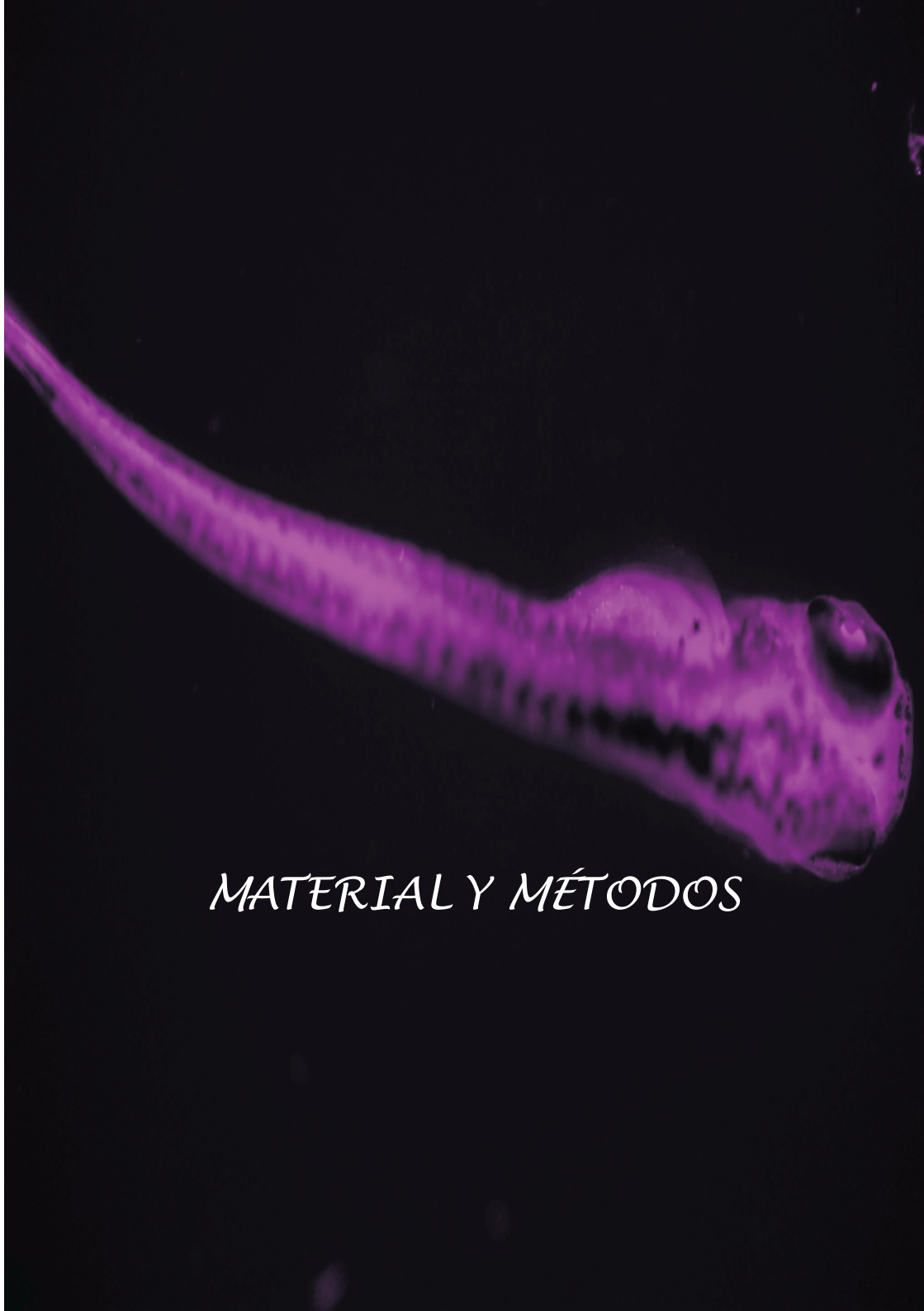


JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Estudios previos han revelado la amplia distribución de DOR en el cerebro de mamíferos y su implicación en funciones varias. En el pez cebra se han analizado mediante hibridación *in situ*, los patrones de expresión de los dos receptores opioides delta clonados hasta la fecha (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006). Dado que este tipo de estudios proporciona escasa información sobre los procesos (dendritas, axones) de las células que expresan este receptor, se pretende analizar y describir la distribución del sistema opioide delta 1 (DOR1) en el encéfalo del pez cebra adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas y de esta manera detallar los circuitos neuronales de este sistema, ampliando el conocimiento sobre la implicación de este receptor en el sistema nervioso de vertebrados.

Así los objetivos planteados en este trabajo son:

1. Conocer la distribución de las poblaciones neuronales inmunorreactivas al receptor opioide delta, (DOR1), en el encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*).
2. Estudiar la organización del receptor opioide delta, DOR1, dentro del encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*).
3. Establecer una conexión entre el receptor opioide delta, DOR1, y su ligando endógeno Met/Leu encefalina dentro del encéfalo adulto del pez cebra (*Danio rerio*).



MATERIAL Y MÉTODOS

1.OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Un total de 100 ejemplares adultos de pez cebra salvaje (*Danio rerio*, *Cyprinidae*, *Telesotei*) han sido requeridos para este estudio. Los ejemplares fueron adquiridos en una tienda especializada (sita en A Coruña) y transportados posteriormente al laboratorio para su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, los ejemplares adultos de pez cebra fueron anestesiados por inmersión en metanosulfonato de tricaína (MS-222, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluido al 0,02% en su propia agua (ajustándose debidamente a pH 7), perfundidos con Ringer para Teleósteos de agua dulce y fijados trasncardialmente con paraformaldehído al 4% (Merck) en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (TF). Seguidamente las cabezas del pez se postfijaron por 24 horas en el mismo fijador para a continuación extraer los cerebros de la caja craneal.

Tras su fijación, los encéfalos fueron lavados en TF durante 24 h y crioprotegidos en disoluciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%) en TF a 4°C. Posteriormente se embebieron en un medio de inclusión específico para criostato (Tissue-Tek OCT Compound: Sakura Finetek Europe, Zuid-Holland, Netherlands) y congelaron en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en nitrógeno líquido. Los cerebros fueron cortados transversalmente en un criostato HM500-M de la casa Microm, a 20°C bajo cero, y las secciones, de 12 µm de grosor, recogidas en portaobjetos gelatinizados. Los cerebros incluidos no utilizados en el momento fueron mantenidos a -20°C.

En todo momento los animales fueron procesados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, BOE núm 34 de 8 de febrero de 2013, sobre el trato de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Previamente al desarrollo del método inmunohistoquímico, las secciones fueron liberadas del medio en el cual se embebieron (Tissue-Tek OCT Compound); para ello las secciones se lavaron durante 15-20 minutos con tampón fosfato salino 0,01 M PH 7,4 (TFS).

Eliminado el medio de inclusión, las secciones se trataron con una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4) 0,1 M en TFS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron tres veces durante 5 minutos con TFS, más un lavado de 5 minutos en TS con 0,1% Tritón X-100 (TFS-T). A continuación se incubaron con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich; Código G6767) diluido 1/10 en TFS durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario. Como antisuero primario fue usado el anti-DOR1 H-60 desarrollado en conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA; sc-9111) diluido 1/500 durante 20 horas a temperatura ambiente. A fin de detectar la expresión conjunta de DOR y su ligando endógeno (encefalina) se empleó la siguiente combinación de antisueros primarios: anti-DOR1 (Santa Cruz) y anti Met/Leu encefalina (anticuerpo primario desarrollado en ratón: Santa Cruz Biotechnology; sc-47705) diluido 1/500 en TFS. Asimismo, algunas series se trataron con anticuerpos contra DOR1 combinados con anticuerpos monoclonales contra la proteína ligante de calcio calretinina (Swant, Bellinzona, Suiza; código 6B3) (Estudios previos demostraron que la calretinina está ampliamente distribuida en el encéfalo del pez cebra (Castro y col., 2006a, b), en este trabajo se empleó la calretinina para observar si tiene relación con DOR1) diluidos 1/500 en TFS. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con TFS (durante 5 min cada lavado, conteniendo el tercer baño un 0,1% de Tritón X-100) y se trataron con

inmunoglobulinas de cabra anti conejo IgG (H+L) acopladas a rhodamine RedTM-X (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR; Cat# R6394) o inmunoglobulinas de cabra anti conejo IgG (H+L) acopladas a fluoresceína (Invitrogen, Molecular Probes; Cat# R6394,) diluidas 1/100 en TFS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las series tratadas con la combinación de anticuerpos primarios anteriormente citada fueron incubadas con los siguientes cócteles de anticuerpos secundarios diluidos 1/100 en TFS durante 1 hora: a) caso de anti-DOR1+anti Met/Leu encefalina, el cóctel empleado constaba de inmunoglobulinas de cabra anti ratón IgG (H+L) acopladas a fluoresceína (Invitrogen, Molecular Probes; Cat# F2761), además de inmunoglobulinas de cabra anti ratón IgG (H+L) acopladas a rodamina RedTM-X (Invitrogen, Molecular Probes) y b) caso de anticuerpo DOR1+anticálcitonina, el cóctel utilizado contenía inmunoglobulinas de cabra anti ratón IgG (H+L) acopladas a rodamina (Invitrogen, Molecular Probes; Cat#F2761), además de inmunoglobulinas de cabra anti conejo IgG (H+L) acopladas a fluoresceína (Invitrogen, Molecular Probes) (las características y diluciones de los anticuerpos empleados se recogen en la tabla 3). Posteriormente las secciones se lavaron 3 veces con TFS (durante 5 minutos cada lavado), se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se montaron con Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).

Para verificar la especificidad de la inmunorreactividad detectada, se llevaron a cabo dos tipos de pruebas control: a) omisión del antisuero primario, siendo sustituido por suero no inmune y desarrollo normal de la prueba inmunohistoquímica (control negativo), b) western-blot (ver siguiente apartado).

3.WESTERN BLOT

Para el análisis (e identificación) de este receptor mediante Western-blot se emplearon extractos cerebrales de pez cebra, mágil y rata. Los extractos se obtuvieron mediante homogenado mecánico en tampón de lisis al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas: 50 mM Tris (pH 7,6), EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, 2- mercaptoetanol 2 μ m, leupeptina 4 mM, aprotinina 0,3 μ m, pepstatina 4mM y fenilmetisulfonyl fluoruro (PMSF) 0,1 mM.

La separación electroforética de las proteínas y péptidos se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico al 10% (SDS-PAGE; 80x50x1 mm) durante 1,5 horas con un voltaje constante de 150 V (Mini-Protean II PAGE System, Bio-Rad, Richmond, CA), aplicándose de 20- 30 μ g de proteína por pocillo en tampón de carga 4X, así como marcadores de peso molecular conocido (Spectra multicolor broad range protein ladder: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; #26634; NZY Colour Protein Marker II: Nzytech, Lisboa, Portugal, código MB09002). Las proteínas electroforéticamente separadas fueron transferidas en un sistema Transblot SD (Bio-Rad) a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,2 μ m (Bio-Rad) a 100 V durante 1 hora.

Los lugares de unión inespecíficos fueron bloqueados mediante incubación durante toda la noche a 4°C con leche descremada en polvo al 5% en tampón tris salino 50 mM pH 7,5 con Tween-20 al 0,1% (TTS-LT) a 4°C. La membrana se incubó durante 20-24 horas a 4°C en una disolución 1/500 de suero anti-DOR1 (ver tabla 3) en TTS-LT; y posteriormente se trató con inmunoglobulinas de cabra anti-conejo marcadas con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, A9169; ver tabla 1) 1/5000 en TTS-LT, durante 1,5 h a temperatura ambiente. Entre cada uno de los pasos citados se hicieron 3 lavados de TTS, de 5 minutos cada uno. El revelado de la actividad peroxidasa

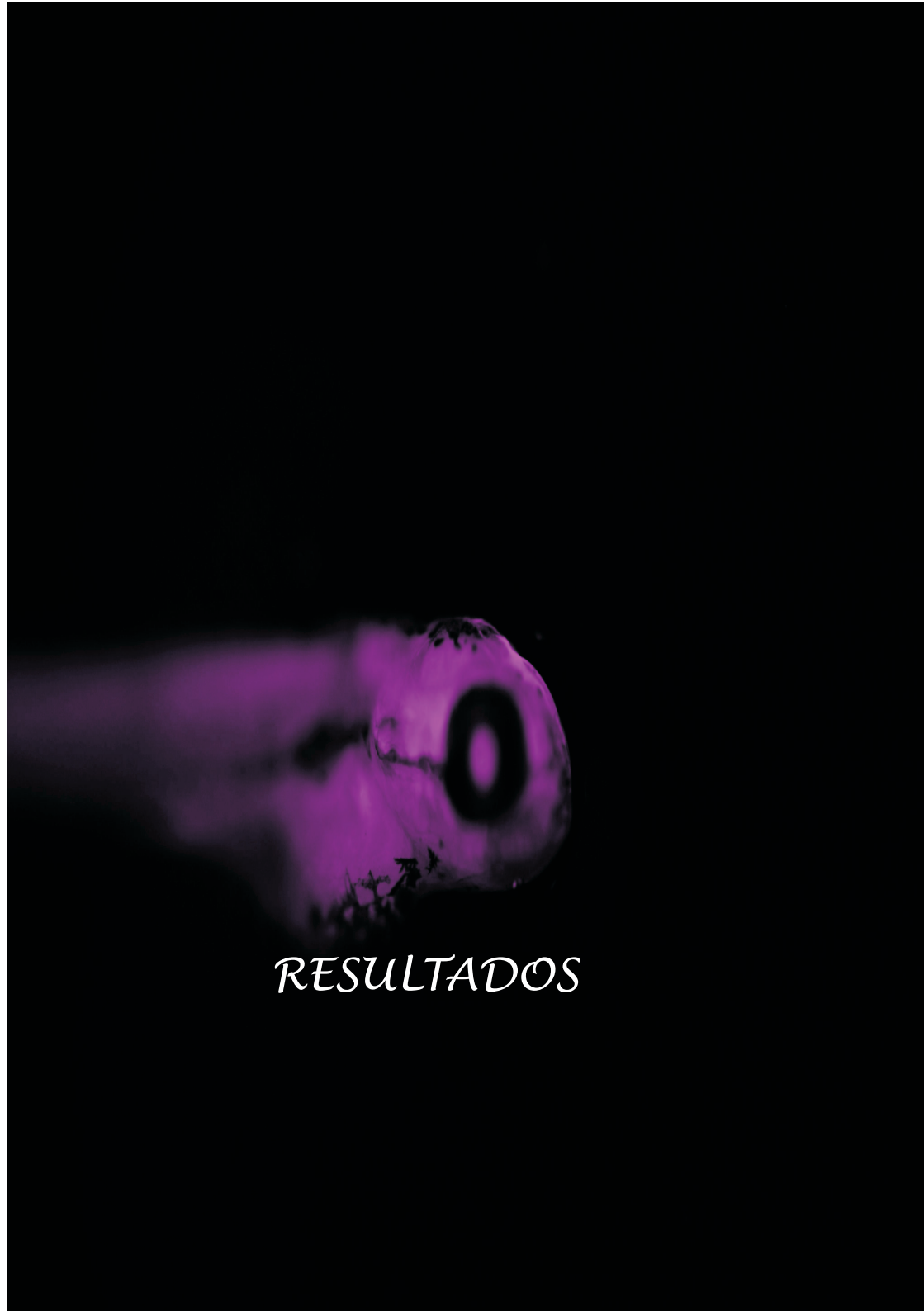
se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (Roche, Basel, Switzerland; ref. 11520709001).

Anticuerpo	Especie	Inmunógeno	Mono/policlonal	Nº catálogo	Dilución	Casa comercial	RRID
Anti-DOR1 H-60	Conejo	Aminoácidos 1-60 del extremo N-terminal de DOR1 de humanos	Policlonal	sc-9111	1/500 (IFI+WB)	Santa Cruz Biotechnology	AB_2156191
Anti-Met/Leu-encefalina	Ratón	Péptido sintético correspondiente a Leu-encefalina de origen humano	Monoclonal	sc-47705	1/500 (IFI)	Santa Cruz Biotechnology	AB_2161515
Calretinina	Ratón	Recombinante humano correspondiente calretinina 22-k	Monoclonal	6B3	1/500 (IFI)	Swant	AB_10000320
Anti-conejo IgG (H+L) unido a rodamina Red™-X	Cabra	IgG de conejo	Policlonal	R6394	1/100 (IFI)	Invitrogen, Molecular Probes	AB_1500693
Anti-ratón IgG (H+L) unido a fluoresceína	Cabra	IgG de ratón	Monoclonal	F2761	1/100 (IFI)	Invitrogen, Molecular Probes	AB_10375588
Anti-conejo IgG-peroxidasa	Cabra	IgG de conejo	Policlonal	A9169	1/5000 (WB)	Sigma-Aldrich	AB_258434
Anti-conejo IgG (H+L) unido a fluoresceína	Cabra	IgG de conejo	Policlonal	F2765	1/100 (IFI)	Invitrogen, Molecular Probes	AB_10562896
Anti-ratón IgG (H+L) unido a rodamina Red™-X	Cabra	IgG de ratón	Monoclonal	R6393	1/100 (IFI)	Invitrogen, Molecular Probes	AB_1500645

Tabla 3. Caracterización de los anticuerpos empleados (IFI: inmunofluorescencia indirecta; RRID: Research Resource Identification; WB: western blot).

4. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES

Las preparaciones obtenidas fueron fotografiadas con una cámara digital (Olympus DP71, Tokio, Japón) acoplada a un microscopio Nikon (Tokio, Japón) con diferentes filtros de fluorescencia. Para el ajuste y transformación de colores (transformación del color rojo al magenta) de las imágenes se utilizó el programa Fiji imagen j (Software de licencia pública general) y el posterior montaje de las planchas se realizó con el programa Corel Draw 12 (corel, Ottawa, Canadá).



RESULTADOS

En el presente trabajo se ha estudiado por primera vez en el cerebro del pez cebra la distribución del receptor opioide delta mediante técnicas inmunohistoquímicas. El empleo de anticuerpos contra DOR1 revela distintas poblaciones neuronales inmunorreactivas a DOR1 (DOR1-ir), así como numerosos sistemas de fibras (axones y otros procesos celulares) en varias regiones del cerebro del pez cebra, complementando los resultados obtenidos previamente mediante hibridación *in situ* por Porteros y col. (1999). La nomenclatura, de los diferentes núcleos, usada en este trabajo está basada en la recogida en el atlas del cerebro del pez cebra de Wullimann y col. (1996).

1. WESTERN BLOT

El análisis mediante el western blot de extractos cerebrales de pez cebra mostró una banda de aproximadamente 60 kDa (Fig. 12.). Se empleó además extracto cerebral de rata, mostrando igualmente una banda de aproximadamente unos 60 kDa, revelando que el anticuerpo empleado para este estudio reconoce específicamente el receptor delta opioide; aunque si reconoce DOR1 o DOR2 no pudo ser determinado.

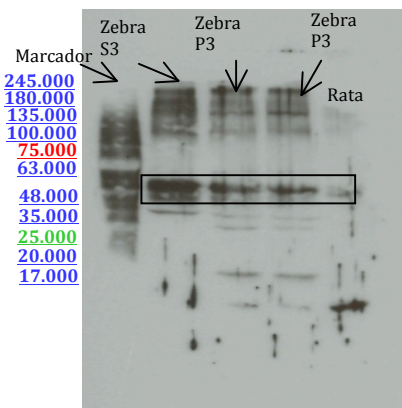


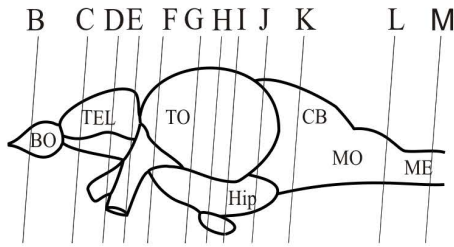
Fig. 12. Western blot de extractos de cerebro de pez cebra y rata, teñidos con el anticuerpo primario anti-DOR1 y revelados mediante quimioluminiscencia. De las varias bandas aparecidas, una banda de aproximadamente unos 60 KDa parece corresponderse con la del receptor opioide delta descrita en otras especies de vertebrados. (S3: sobrenadante; P3: pellet).

2. DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR, EN EL ENCÉFALO DEL PEZ CEBRA ADULTO.

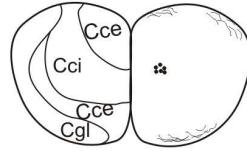
El receptor opioide delta muestra una amplia distribución en el cerebro del pez cebra adulto (Fig.13). En este sentido, los resultados obtenidos se describirán atendiendo a las diferentes subdivisiones del cerebro del pez cebra en las cuales ha sido observadas neuronas y fibras inmunorreactivas a DOR1 en sentido rostro-caudal.

Fig. 13. Representación esquemática de secciones transversales del encéfalo del pez cebra, mostrando el patrón de distribución de neuronas (círculos) y fibras (líneas) inmunorreactivas a DOR1 (Bu M). En A se representa el nivel de dichas secciones.

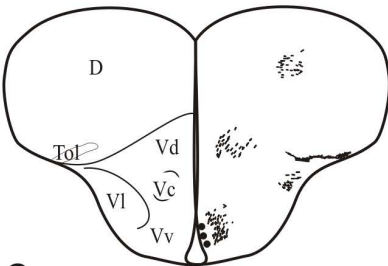
Barras de escala: 215 μm (A); 185 μm (B); 300 μm (C); 260 μm (D); 250 (E); 280 μm (F), 300 μm (G); 270 μm (H); 340 μm (I); 260 μm (J); 235 μm (K-L); 250 μm (M).



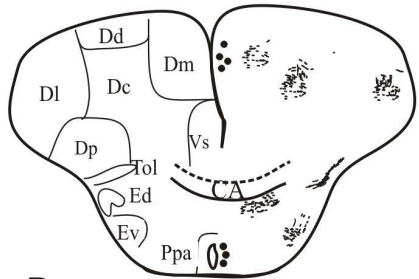
A



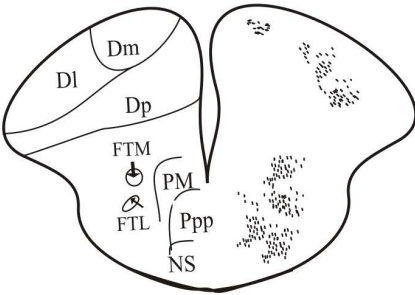
B



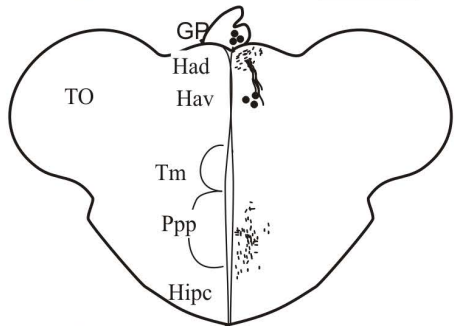
C



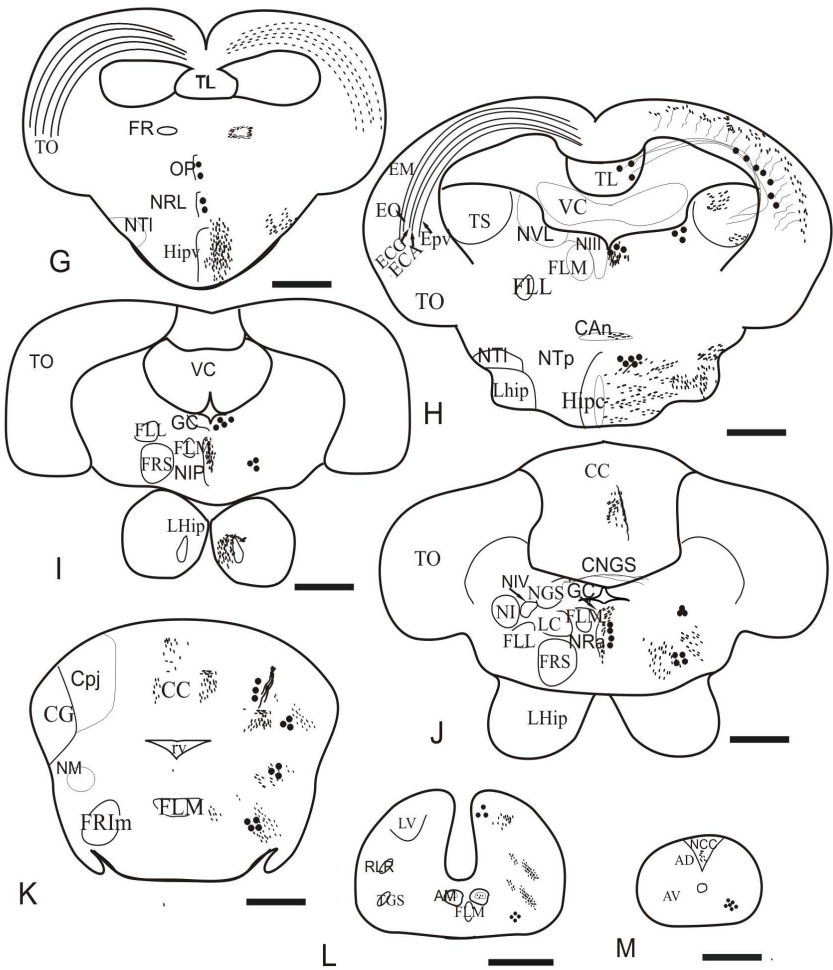
D



E



F



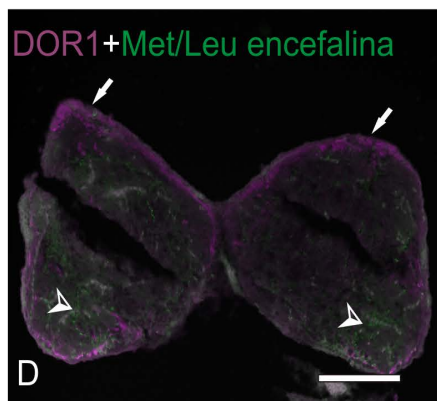
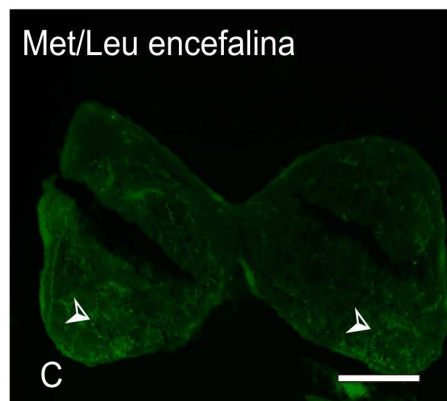
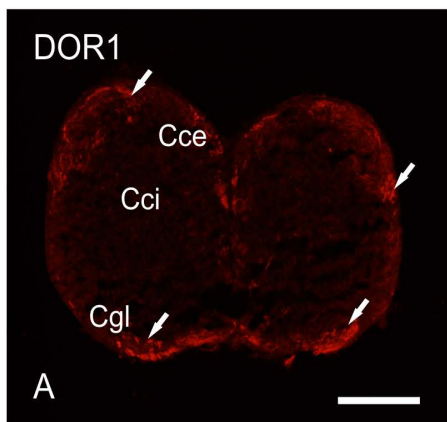
2.1 Roseta olfativa y bulbos olfativos

La roseta olfativa de individuos juveniles del pez cebra mostró inmunorreactividad a DOR1 (resultados no incluidos en este trabajo) en algunas células receptores olfativas y sus fibras, las cuales terminan por reunirse y formar un nervio conspicuo DOR1-ir, que entra en los bulbos olfativos rostroventralmente. Estas fibras alcanzan la capa glomeurlar del bulbo olfativo dando lugar a finos y difusos plexos DOR1-ir en los que las ramificaciones terminales individuales apenas se pueden apreciar. Los bulbos olfativos del pez cebra también contienen fibras arrosariadas DOR1-ir distribuidas por las capas celulares externa e interna. Capas que contienen además células con una débil inmunorreactividad, mostrando una apareciencia granular alrededor del núcleo. Hacia la superficie caudodorsal (de los bulbos olfatorios) se observa una acumulación de fibras DOR1-ir, continuándose con un conspicuo tracto DOR1-ir que seguía la trayectoria del tracto olfatorio lateral. Dado que no se han advertido células mitrales DOR1-ir en los bulbos olfatorios del pez cebra, las fibras observadas parecen corresponderse con aferencias que alcanzan los bulbos olfatorios a través del tracto olfatorio lateral (Fig. 14A, B). Los bulbos olfatorios de individuos juveniles de pez cebra, muestran una gran cantidad de fibras DOR1-ir distribuidas tanto en la capas celulares externas como en las internas, observándose que no existen diferencias sustancias en la densidad de fibras entre las distintas capas distinglibles en el bulbo olfatorio del pez cebra (resultados no incluidos en este trabajo).

En la región ventrolateral de los bulbos olfatorios se puede observar un grupo compacto de fibras Met/leu encefalina-ir (Fig. 14C). Doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina revela una coexistencia de receptor y ligando en está región del bulbo olfatorio del pez cebra, sin que se aprecie una expresión conjunta en los mismos procesos (Fig. 14D).

62 Resultados

Fig. 14. Microfotografías de secciones transversales del bulbo olfativo del pez cebra, mostrando fibras inmunorreactivas a DOR1 (A-B) y Met/Leu encefalina (C) y doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (D). A-B, fibras DOR1-ir a nivel de los glomérulos de la región dorsal y ventral de los bulbos olfatorios inmunorreactivos a DOR1 (flechas). C, glomérulos de la región ventrolateral de los bulbos olfatorios inmunorreactivos a Met/Leu encefalina (puntas de flechas). D, Inmunofluorescencia doble para DOR1u Met/Leu encefalina (DOR1, flechas; Met/Leu encefalina, puntas de flechas). Barras de escala: 75 μ m (A-D).



2.2 Telencéfalo: hemisferios telencefálicos

En los hemisferios telencefálicos del pez cebra se pueden distinguir dos regiones principales: un área telencefálica dorsal (palio) y un área telencefálica ventral (subpalio).

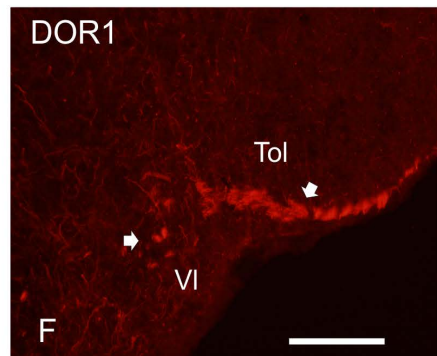
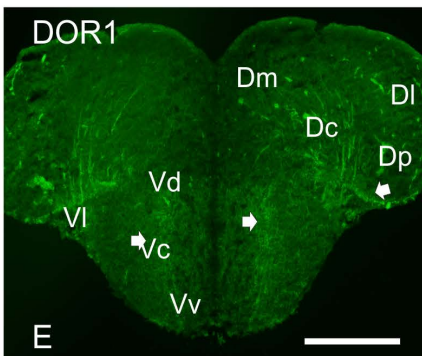
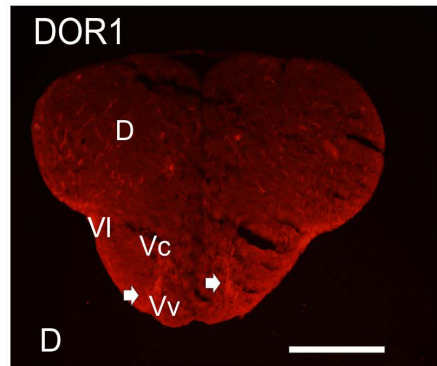
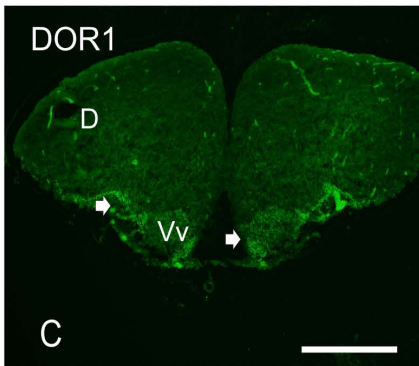
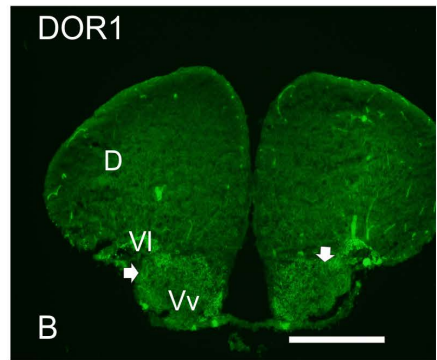
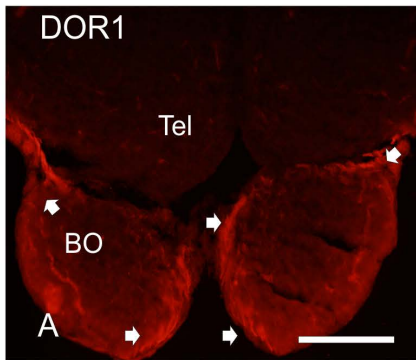
En el área ventral telencefálica del pez cebra se pueden distinguir varios núcleos: dorsal (Vd), ventral (Vv), central (Vc), lateral (Vl), supracomisural (Vs) y posterior (Vp). Esta región muestra numerosas fibras DOR1-ir, siendo especialmente abundantes en Vv y Vd (Fig. 15). Muchas de estas fibras integran el tracto telencefálico medial, extendiéndose desde este tracto hacia áreas laterales y Vv. Así mismo, se pueden observar células débilmente DOR1-ir, disponiéndose en hileras paralelas al ventrículo a niveles caudales de Vv. Caudalmente a la comisura anterior, se aprecia un gran número de fibras DOR1-ir discurriendo en el fascículo telencefálico medial (Fig. 15G). En esta región se puede observar un gran número de fibras Met/Leu encefalina-ir, aunque a diferencia de lo observado para DOR1 no aparecen asociadas al fascículo longitudinal telencefálico medial (Fig. 15H), distribuyéndose por regiones más ventrales y en mayor número que las fibras DOR1-ir (Fig. 15I).

El área dorsal telencefálica del pez cebra puede subdividirse en varias zonas: medial (Dm), lateral (Dl), dorsal (Dd), central (Dc) y posterior (Dp) (Castro y col. 2006 a; Muller y col. 2011). Aunque algunas de estas regiones parecen bastante heretogéneas neuroquímicamente (Castro y col., 2006), inmunofluorescencia para DOR1 revela únicamente ciertas diferencias entre regiones en relación a la densidad de fibras. Las regiones anteriores de Dm y Dl muestran una escasa presencia de fibras DOR1-ir. A niveles más caudales, la parte dorsal de Dm (Dm1 de Castro y col., 2006a) presenta una densidad moderada de fibras DOR1-ir. Por el contrario, la región central (Dc) a niveles telencefálicos medios exhibe numerosos fascículos DOR1-ir (Fig. 15E, F),

extendiéndose en forma de abanico desde el fascículo telencefálico lateral hacia Dc (principalmente a niveles rostrales a la comisura anterior). En su camino hacia el palio, estos fascículos positivos cruzan la región medial del tracto olfatorio lateral.

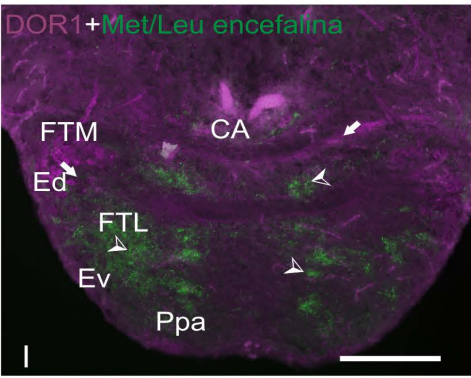
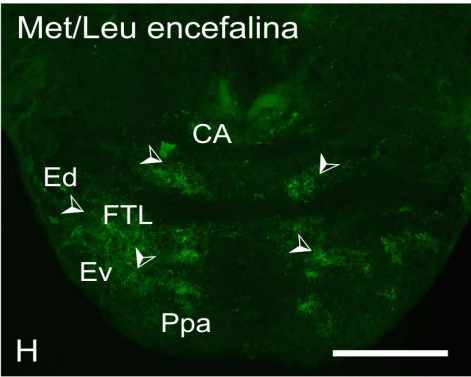
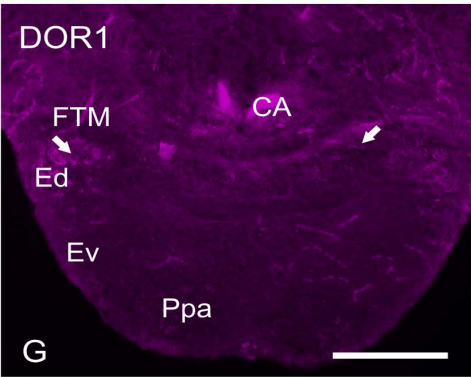
En el palio del pez cebra solo se han observado algunas células tenuamente inmunorreactivas a DOR1 en la porción periventricular de Dm (Fig. 15E)

Fig. 15. Microfotografías de secciones transversales de los hemisferios telencefálicos del pez cebra adulto, mostrando fibras inmunorreactivas a DOR1. A-B, fibras DOR1-ir a nivel de los glomérulos de los bulbos olfativos mostrando su continuación hacia regiones ventrales del telencéfalo (flechas). C, fibras inmunorreactivas a DOR1 en Vv (flecha). D, fibras DOR1-ir en Vv y VI (flechas). E, fibras DOR1-ir en Vc y Dc (flechas). F, fibras inmunorreactivas a DOR1 en VI y tracto olfativo lateral (flechas). Barras de escala: A: 70 μm (A); B: 165 μm (B); C: 175 μm (C); D: 270 μm (D); E: 210 μm (E); F: 40 μm (F).



68 *Resultados*

Fig. 15 continuación. Microfotografías de secciones transversales de los hemisferios telencefálicos del pez cebra adulto, mostrando fibras inmunorreactivas a DOR1 (G) y Met/Leu encefalina (H) y doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (I). G, fibras DOR1-ir a nivel del fascículo telencefálico medial (flechas). H, fibras inmunorreactivas a Met/Leu encefalina a nivel del fascículo telencefálico lateral (punta de flecha). I, inmunofluorescencia doble para DOR1 y Met/Leu encefalina (DOR1, flechas; Met/Leu encefalina, puntas de flechas). Barras de escala: 85 μ m (G-I).



2.3 Región preóptica, hipotálamo y túbculo posterior

En la región preóptica, localizada alrededor del receso preóptico, se pueden apreciar un gran número de fibras DOR1-ir. Estas se encuentran distribuidas por el área intermedia y entre las células de la región periventricular. Los fascículos telencefálicos lateral y medial también muestran abundantes fibras DOR1 (Fig. 16A). Asimismo, en la parte anterior del núcleo preóptico parvocelular se pueden observar numerosas neuronas cuyos pericariones exhiben una débil inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 16B). Este mismo núcleo contiene también neuronas positivas al pentapéptido Met/Leu encefalina, si bien la inmunorreactividad presentada por los somas es más intensa que la observada con DOR1 (Fig. 16C). La posible colocalización de receptor y ligando fue estudiada mediante doble inmunofluorescencia, apreciándose que las inmunorreactividades a DOR1 y a Met/Leu encefalina aparecen asociadas a diferentes células del núcleo preóptico parvocelular anterior (Fig. 16D).

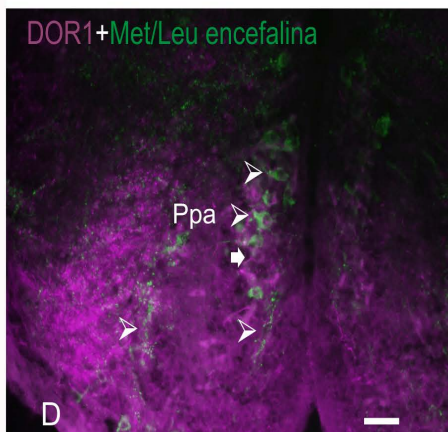
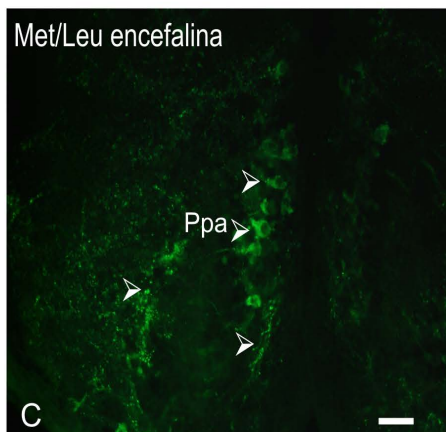
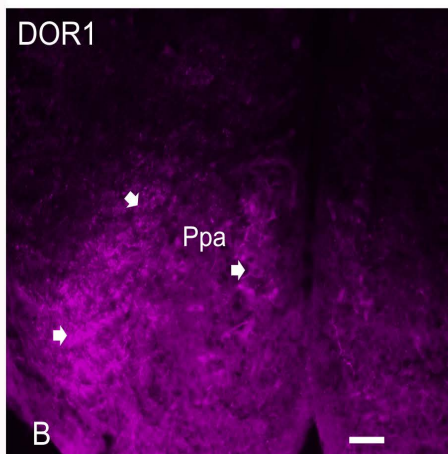
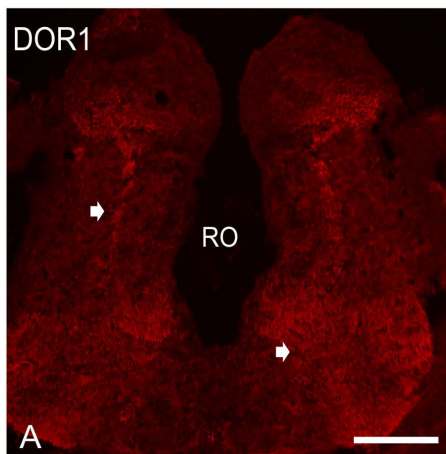
Numerosas células, intensamente DOR1-ir fueron observadas en el órgano periventricular el cual incluye una porción rostral en la pared del tercer ventrículo (Fig. 17A.) y poblaciones más caudales que forman el núcleo del receso lateral (Fig. 17B). Por su localización, estas células parecen corresponderse con células tipo líquido cerebrospinal contactantes. También pudieron apreciarse células débilmente inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo posterior del túbulo (Fig. 17C).

En la transición entre la región preóptica y el hipotálamo rostral, algunas fibras DOR1-ir cruzan la línea media a nivel de la comisura postóptica, si bien el quiasma y el tracto óptico, así como la comisura horizontal carecían de estas fibras (Fig. 17D). A este nivel los fascículos telencefálicos lateral y medial muestran un gran número de fibras DOR1-ir.

Más caudalmente, y medialmente al núcleo preglomerular anterior, un conspicuo tracto de fibras DOR1-ir cursa entre el fascículo telencefálico medial y el tracto de la comisura horizontal hacia la superficie ventral del hipotálamo (Fig. 17D), intervando densamente regiones más caudales. Las regiones mediales del hipotálamo intermedio y caudal, incluidos el lóbulo hipotalámico posterior y el núcleo del tubérculo posterior, contienen abundantes fibras DOR1-ir, si bien el núcleo anterior del tuber (Fig. 17E), el complejo preglomerular/mamilar, el núcleo gustatorio terciario, el núcleo difuso del lóbulo hipotalámico inferior y el toro lateral presentan escasas o carecían prácticamente de fibras DOR1-ir. Asimismo, un pequeño, pero conspicuo, tracto DOR1-ir puede seguirse a través del tegmento mesencéfalo basal hacia la región caudomedial del lóbulo hipotalámico, terminando en el rico neuropilo DOR1-ir del lóbulo hipotalámico posterior (Fig. 17F, G).

72 *Resultados*

Fig. 16. Microfotografías de secciones transversales de la región preóptica del pez cebra adulto, mostrando fibras (A) y neuronas inmunorreactivas a DOR1 (B) y Met/Leu encefalina (C) y doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (D). A, fibras inmunorreactivas a DOR1 en la región preóptica alrededor del receso óptico (flechas). B, cuerpos neuronales DOR1-ir en el núcleo preóptico parvocelular anterior (flechas). C, cuerpos neuronales Met/Leu encefalina-ir en el núcleo preóptico parvocelular anterior (flechas). D, inmunofluorescencia doble para DOR1 y Met/Leu encefalina (DOR1, flecha; Met/Leu encefalina, punta de flecha). Barras de escala: A: 75 μm (A); B-D: 15 μm (B-D).



74 *Resultados*

Fig. 17. Microfotografías de secciones transversales del hipotálamo y del tubérculo posterior del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (A-D). A, cuerpos celulares inmunorreactivos a DOR1 en el órgano perivenricular (flechas) y fibras DOR1-ir en el hipotálamo ventral (flechas) B, cuerpos neuronales DOR1-ir en el órgano periventricular (flecha) y en el núcleo del receso lateral (flecha). C, cuerpos neuronales inmunorreactivos a DOR1 en el núcleo tuberal posterior (flecha) y fibras DOR1-ir en el núcleo tuberal lateral (flecha). D, fibras inmunorreactivas a DOR1 entre el fascículo telencéfalo lateral y la comisura horizontal, y tracto de fibras inmunorreactivo a DOR1 en el núcleo pretectal periventricular (flecha). Barras de escala: A: 80 μm (A); B: 10 μm (B); C: 70 μm (C); D: 65 μm (D).

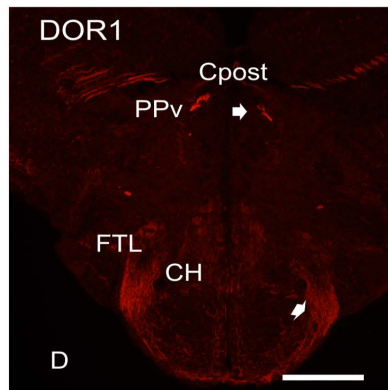
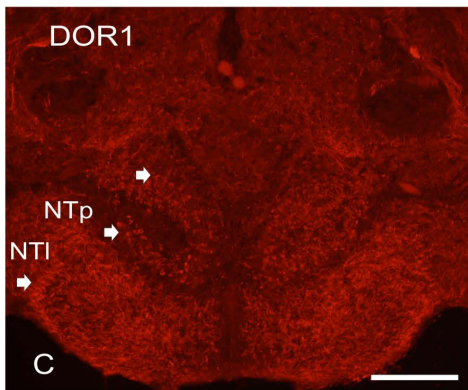
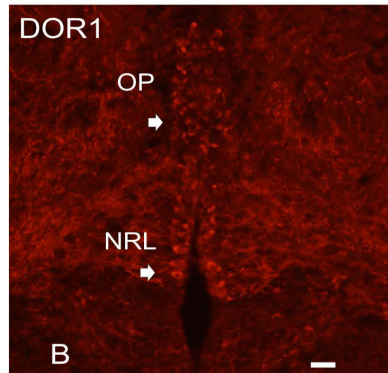
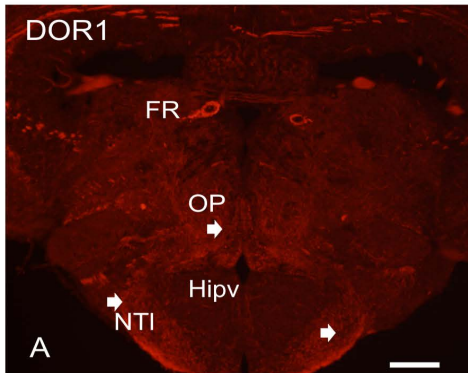
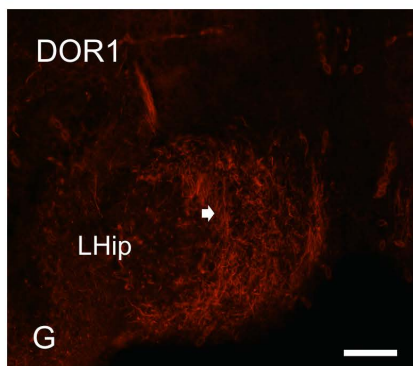
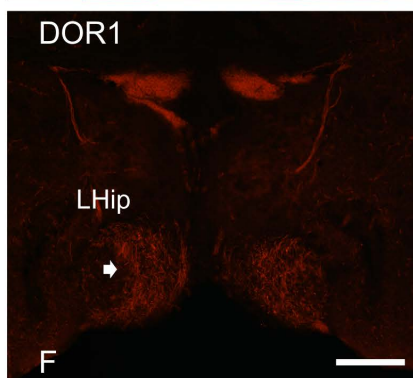
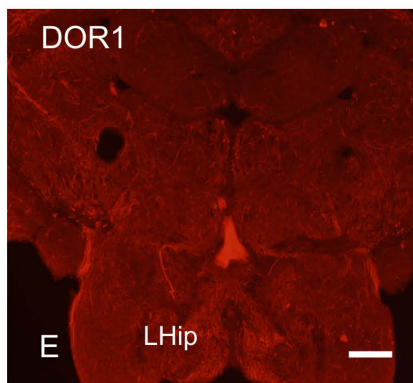


Fig. 17 continuación. Microfotografías de secciones transversales del hipotálamo y del tubérculo posterior del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (E-F). E-F, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el lóbulo hipotalámico posterior (flecha). Barras de escala: E: 80 μm (E); F: 65 μm (F); G: 25 μm (G).



2.4 Epitálamo

El órgano pineal del pez cebra contiene células intensamente inmunorreactivas a DOR1, mostrando éstas (células ganglionares pineales) un pericarion redondeado y procesos en dirección a las capas externas del epitelio. Asimismo, fibras DOR1-ir forman un tracto pineal que cursa en el tallo hacia la comisura posterior para dividirse y entrar bilateralmente en el pretecho y tálamo dorsal (Fig. 18A, B).

No se observaron cuerpos celulares inmunorreactivos a Met/Leu encefalina en el órgano pineal. En cambio, si se observó en esta región un grupo de fibras cercanas al tracto pineal (Fig. 18C). Mediante la doble inmunohistoquímica realizada para DOR1 y Met/Leu encefalina se observó, que las fibras Met/Leu encefalinau ir a pesar de encontrarse próximas al tracto pineal, no forman parte de el, por tanto podemos llegar a decir que las fibras Met/Leu encefalinau ir observadas en está región no proceden de la glándula pineal (Fig. 18D).

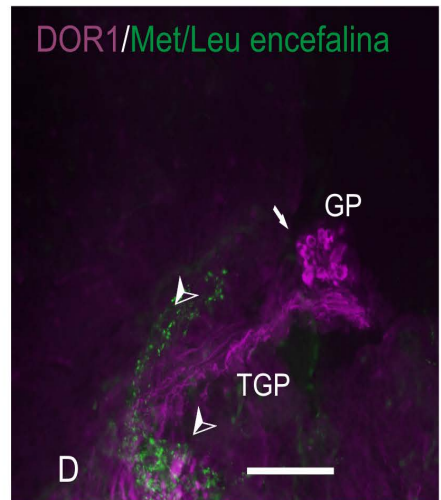
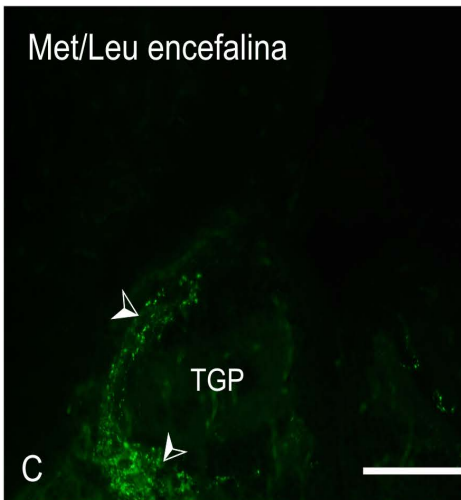
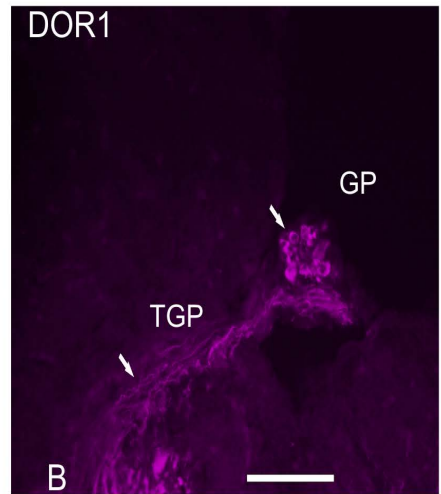
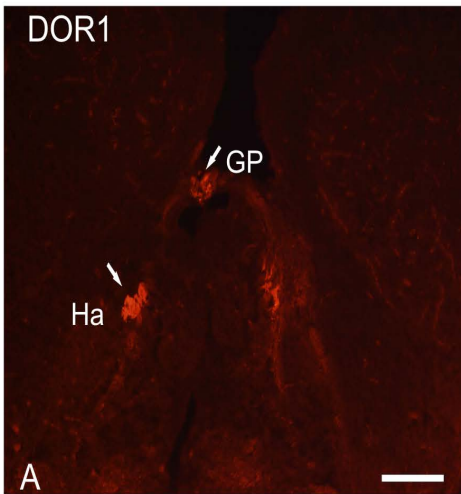
La habénula del pez cebra consiste en una región dorsal, homóloga al núcleo habenular medial del núcleo de mamíferos, y una región ventral, homóloga al núcleo habenular lateral de mamíferos (Amo y col., 2010; Aizawa y col., 2011). Los resultados obtenidos muestran una distribución difrencial de la inmunorreactividad a DOR1 entre los núcleos dorsal y ventral, así como una asimetría derecha/izquierda en el núcleo dorsal (Fig. 18E). El núcleo ventral muestra pericariones débilmente inmunorreactivos a DOR1 en la mayoría de sus células (y en toda su extensión). Este núcleo es el primero en aparecer en secciones rostrou caudales, debiendo ser referenciado como núcleo habenular rotral en vez de ventral. Por su parte, el núcleo dorsal presenta numerosas fibras DOR1-ir (Fig. 18F); estas pueden seguirse caudoventralmente hacia el fascículo retroflexo en el cual forman una vaina alrededor de una región

central carente de inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 18C, H), indicando una segregación de diferentes tipos funcionales de fibras en el fascículo. Un pequeño fascículo de fibras DOR1-ir se extiende entre este núcleo habenular y el fascículo telencefálico medial, aunque el origen de estas fibras no pudo ser determinado. En la habénula dorsal izquierda las fibras DOR1-ir forman dos neuropilos, uno dorsal y otro intermedio, con una región inmunonegativa entre ambos atravesada por pequeños fascículos positivos. En la habénula derecha, no se apreció una región dorsal DOR1-ir similar. Mientras que la inmunorreactividad a DOR1 pudo ser fácilmente apreciada en células de la habénula ventral, éstas apenas pudo evidenciarse en los pericariones del núcleo dorsal dado el gran número de fibras DOR1-ir.

Por otro lado, fibras encefalinérgicas muestran una distribución diferente en la región habenular a lo visto con DOR1, estando localizadas en regiones ventromediales donde hay una escasa inmunoreactividad a DOR1

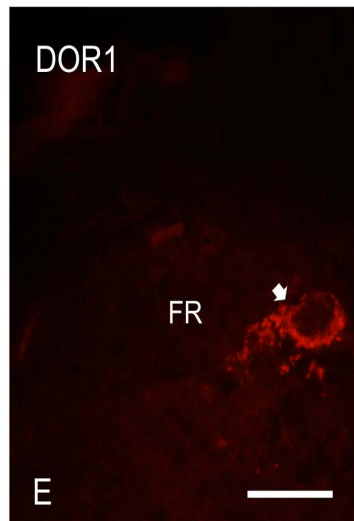
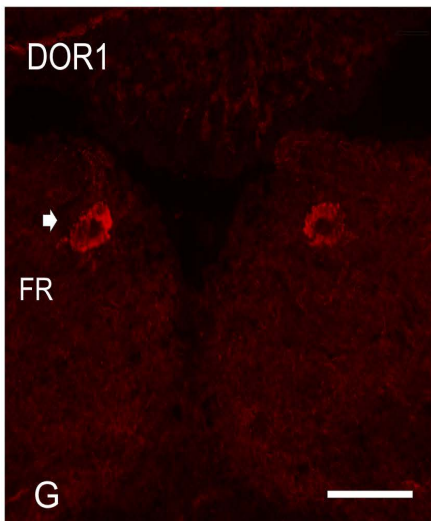
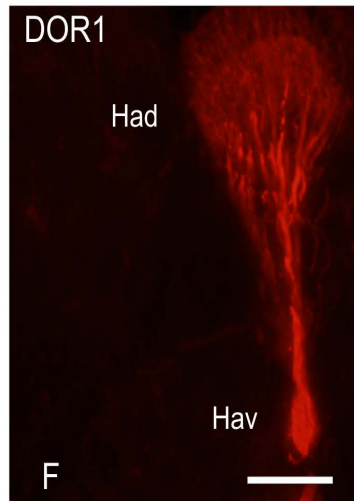
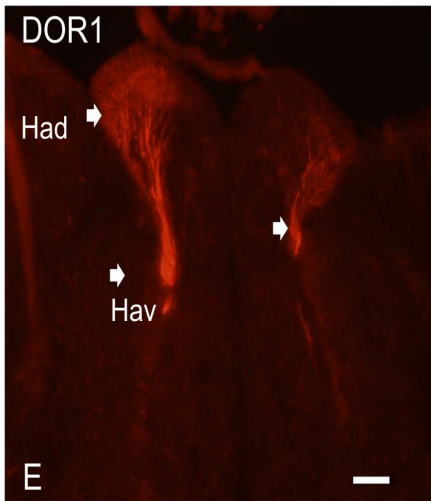
80 Resultados

Fig. 18. Mirofotografías de secciones transversales de la región del epítalamo del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (A-B) y Met/Leu encefalina (C), y doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (D). A, cuerpos celulares inmunorreactivos a DOR1 en la glándula pineal (flecha) y en la habénula (flecha). B, cuerpos celulares inmunorreactivos a DOR1 en la glándula pineal y fibras DOR1-ir en el tracto de la glándula pineal (flecha). C, fibras Met/Leu encefalina-ir a nivel del tracto de la glándula pineal (punta de flecha). D, doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (DOR1, flecha; Met/Leu encefalina, punta de flecha). Barras de escala: A: 50 μm (A); B: 35 μm (B); C: 40 μm (C); D: 35 μm (D).



82 *Resultados*

Fig. 18 continuación. Microfotografías de secciones transversales de la región del epitálamo del pez cebra adulto, mostrando fibras inmunorreactivas a DOR1 (E-H). E-F, fibras inmunorreactivas a DOR1 en la habénula dorsal y ventral (flechas). G-H, fibras DOR1-ir en el fascículo retroflexo (flechas). Barras de escala: E:30 μm (E); F: 25 μm (F); G: 70 μm (G); H:35 μm (H).



2.5 Tálamo y pretecho

El pretálamo y el talámo muestran una pobre innervación a DOR1-ir en la mayoría de sus regiones, aunque fibras DOR1-ir del tracto pineal forman campos terminales en áreas del neuropilo medial del talámo dorsal y del pretecho.

El pretecho del pez cebra está formado por varios núcleos localizados en regiones superficiales y mediales (Castro y col., 2006 a). La mayoría de los núcleos pretectales carecen de innervación DOR1-ir, apreciándose algunas fibras DOR1-ir cruzando la comisura posterior.

2.6 Techo óptico y toro longitudinal

El techo óptico es el principal centro visual en el pez cebra. Se trata de una estructura constituida por capas compuestas por capas de células y fibras. Las fibras DOR1-ir observadas en esta estructura se disponen en cinco finas capas horizontales distribuidas equidistantemente entre los estratos periventricular y marginal, mostrando las dos capas más externas delgados procesos nerviosos, así como fibras orientadas radialmente entre las distintas capas del techo óptico (Fig. 19A). Asimismo se pueden apreciar fascículos de fibras DOR1-ir cursando en el *stratum album centrale* y cruzando el *stratum periventriculare* y el toro semicircular en dirección al tegmento, aunque no pudo ser determinado si estas fibras eran aferentes, eferentes o ambas. En algunos casos, estos fascículos de fibras pueden seguirse en la región reticular de ambos lados hacia la línea media, formando parte de un sistema comisural tegmental dorsal. También pueden apreciarse conspicuos tractos de fibras DOR1-ir continuos con fibras del *stratum album centrale* cruzando la comisura tectal (Fig. 19B). En el estrato marginal del techo óptico los procesos

DOR1-ir son escasos si los comparamos con lo observado en el resto de estratos.

El techo óptico del pez cebra contiene pericariones débilmente inmunorreactivos a DOR1 en el estrato periventricular y probablemente también estén presentes en el otros estratos tectales, aunque no pudieron ser detectados inmunohistoquímicamente en el presente trabajo.

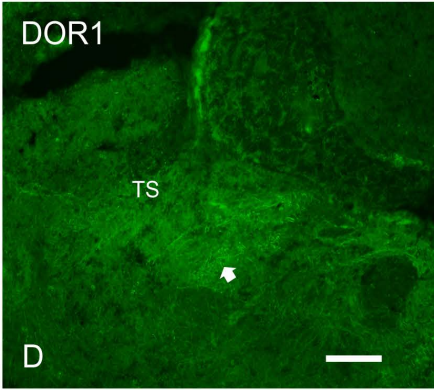
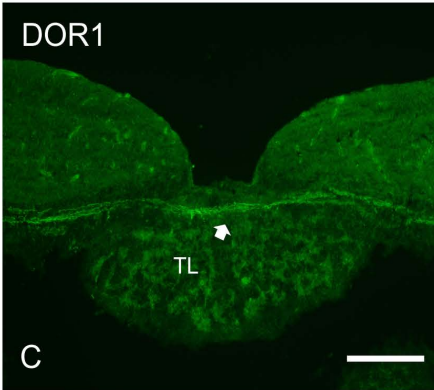
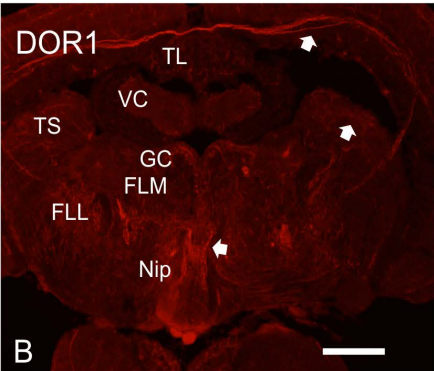
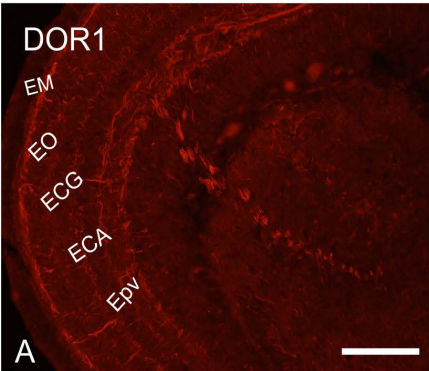
En el toro longitudinal se pueden apreciar algunas células débilmente DOR1-ir entre numerosas neuronas (inmuno)negativas. La presencia de finos procesos DOR1-ir en el estrato marginal del techo óptico sugiere que algunas células DOR1-ir se corresponden con neuronas toro-tectales. Asimismo, el toro longitudinal contiene numerosos procesos DOR1-ir entre las células granulares (Fig. 19C).

2.7 Toro semicircular y tegmento

En el tegmento mesencefálico del pez cebra se pueden distinguir varias poblaciones DOR1-ir. Los pericariones de las neuronas del núcleo oculomotor muestran inmunorreactividad a DOR1 de apariencia granular, sugiriendo una localización de dicho receptor en vesículas citoplasmáticas. Alrededor de estas motoneuronas se pueden observar numerosos procesos y botones DOR1-ir de pequeño tamaño. Sin embargo, las fibras motoras de estas células no aparecían inmunomarcadas. Lateralmente, al núcleo oculomotor, se pueden apreciar células de pequeño tamaño débilmente inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo lateral de la válvula, así como procesos de tipo botón más intensamente teñidos. En la región tegmental basal se pueden observar numerosas fibras DOR1-ir cursand en la comisura *ansulate*.

El toro semicircular del pez cebra se encuentra pobremente innervado por fibras DOR1-ir, distribuidas por las regiones ventromedial y dorsomedial (Fig. 19D). Algunas fibras DOR1-ir pudieron apreciarse cursando en el fascículo longitudinal lateral, así como fascículos de fibras tectales DOR1-ir cruzando a través del toro semicircular (Fig. 19B). Asimismo, pueden observarse fibras positivas siguiendo el curso del tracto gustatorio terciario en regiones tegmentales intermedias.

Fig. 19. Microfotografías de secciones transversales del techo óptico, toro longitudinal y toro semicircular del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (A-D) A, fibras inmunorreactivas a DOR1 en las capas del techo óptico (flechas). B, fibras inmunorreactivas a DOR1 cruzando la comisura tectal (flecha). C, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el toro longitudinal (flecha). C, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el toro semicircular (flecha). Barras de escala: 65 μm (A); 100 μm (B); 35 μm (C); 25 μm (D).



2.8 Cerebelo y válvula cerebelar

En el cerebelo (Fig. 20A), las células de Purkinje (Fig. 20B) y algunas células de la capa granular, muestran una moderada y débil inmunorreactividad a DOR1 respectivamente. Justo debajo de la capa de células de Purkinje, pueden observarse conspicuas fibras DOR1-ir, las cuales parecen corresponderse con axones de Purkinje contactando con células eurodendroides (las cuales son consideradas homologas a las de núcleos cerebelosos profundos de mamíferos y otros vertebrados). En la capa granular también pueden apreciarse fibras DOR1-ir. Unos pocos (y gruesos) paquetes de fibras DOR1-ir cruzan la capa granular entre la capa de las células de Purkinje y el pedúnculo cerebeloso (Fig. 20C, D). Contrariamente a la abundancia de procesos DOR1-ir observados, el pez cebra presenta escasas fibras encefalina-ir.

2.9 Rombencéfalo rostral

El istmo y el rombómero I forman una región especial en el rombencéfalo rostral el cual da lugar al cerebelo dorsal. En teleósteos, el istmo y el rombómero I también darán lugar al núcleo troclear, núcleo del istmo, núcleo gustatorio, núcleo interpeduncular, algunos núcleos tegmentales, núcleos del rafe, formación reticular del rombencéfalo rostral, *locus coeruleus*, y gris central, entre otros. Varios de estos núcleos contienen neuronas DOR1-ir, describiéndose las mismas a continuación.

El núcleo troclear contiene motoneuronas DOR1-ir de apariencia similar a las observadas en el núcleo oculomotor, estando ambos núcleos innervados por algunas fibras encefalinérgicas.

El núcleo interpeduncular se localiza en la región ístmica ventromedial distinguiéndose en el mismo un neuropilo dorsal y otro ventral, con una región intermedia entre ambos. De estas tres regiones, la intermedia es la que recibe una mayor innervación DOR1-ir, sin que existan notables diferencias entre ellas. Los tractos que cursan justo lateralmente al neuropilo ventral del núcleo interpeduncular (procedentes de la habénula ventral) carecen de fibras DOR1-ir (Fig. 21A, B). Numerosas fibras DOR1-ir también pudieron observarse en la línea media del rombencéfalo rostral, caudalmente a los núcleos troclear e interpeduncular entre los dos fascículos longitudinales mediales y en la región de los núcleos serotoninérgicos del rafe superior y medial (Kaslin y Panula, 2001) (Fig. 21C).

La región del gris central rombencefálico se encuentra ricamente innervada por fibras DOR1-ir formando una conspicua banda en forma de “C” medialmente al fascículo longitudinal medial (Fig. 21D). En la región ventromedial del gris central también puede apreciarse una gran concentración de fibras DOR1-ir (Fig. 21E, F), así como de fibras encefalinérgicas (Fig. 21G), conteniendo algunas de ellas ambas sustancias (Fig. 21H). Aunque el gris central parecía contener pericariones débilmente DOR1-ir (Fig. 22A), no pudo determinarse si estas fibras eran aferencias a esta región o eferencias.

Las neuronas de los núcleos del rafe superior y medial se localizan en la línea media de esta región, mostrando éstas una muy débil DOR1-ir. Tanto gris central como los núcleos del rafe reciben una abundante innervación encefalinérgica, que solo se superpone parcialmente con la inmunorreactividad observada para DOR1.

Lateralmente al gris central, las grandes neuronas del *locus coeruleus* no muestran inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 22B).

Igualmente, en la formación reticular superior también se pueden apreciar algunas células reticulares (de gran tamaño) DOR1-ir, encontrándose esta región ricamente invadida por fibras DOR1-ir.

Dorsolateralmente al gris central en el rombencéfalo rostral del pez cebra se encuentra el núcleo visceral/gustatorio secundario, con una región visceral general en su porción ventral y una región gustatoria localizada dorsalmente, unida al núcleo contralateral por medio de la comisura visceral secundaria (Castro y col., 2006b). Numerosas fibras DOR1-ir pueden observarse en una banda ventralmente a este núcleo, asociadas con la región visceral general, estando, por el contrario, ausentes en la región gustatoria dorsal, indicando una especialización de esta región que también recibe fibras encefalinérgicas, ausentes en la parte dorsal del núcleo gustatorio secundario. Desde esta región ventral, las fibras DOR1-ir cursan en la comisura visceral secundaria, principalmente por su porción ventral, cruzando la línea media, aunque la mayor parte de la comisura carece de inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 22C). Estas fibras comisurales DOR1-ir se continúan con el tracto que cursa ventralmente al tracto gustatorio secundario. Lateralmente al núcleo visceral/gustatorio secundario se encuentra el núcleo del istmo, el cual presenta una escasa invervación DOR1-ir (Fig. 22D).

Fig. 20. Microfotografías de: secciones transversales del cerebelo y la válvula cerebelar del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad pa DOR1 en fibras y cuerpos celulares (A-D) . A, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el cuerpo cerebelar (flecha). B, fibras y cuerpos celulares inmunorreactivos a DOR1 en la capa granular (flechas). C-D, fibras inmunorreactivas a DOR1 cruzando la capa granular entre la capa de células de Purkinje y el pedúnculo cerebelar (flecha). Barras de escala:A: 30 μm (A); B: 160 μm (B); C: 120 μm (C); D: 55 μm (D).

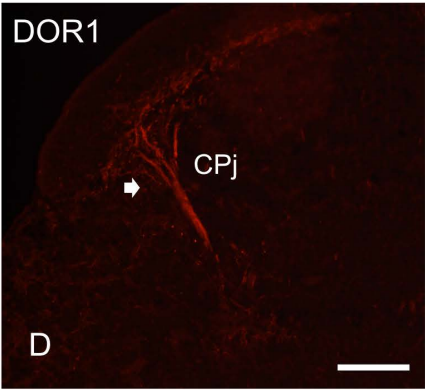
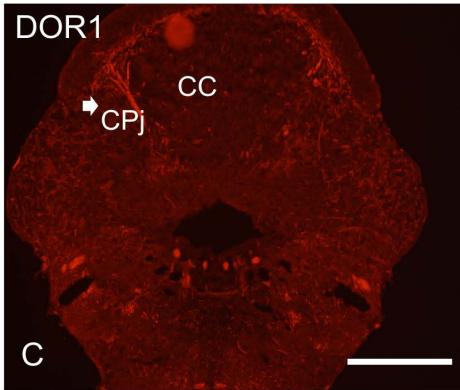
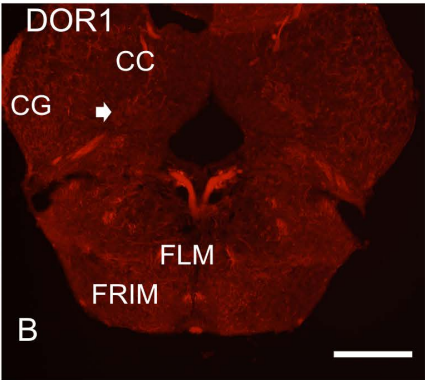
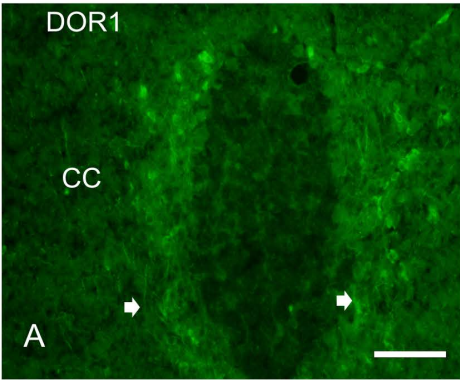


Fig. 21. Microfotografías de secciones transversales de la región del rombéncefalo rostral del pez cebra adulto (A-D). A- B, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo interpeduncular (flechas). C, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo de rafe dorsal y el núcleo del rafe medial (flechas). D, fibras inmunorreactivas a DOR1 en gris central y en el núcleo del rafe (flechas). Barras de escala: A: 50 μm (A); B: 35 μm (B); C : 45 μm (C); D: 30 μm (D).

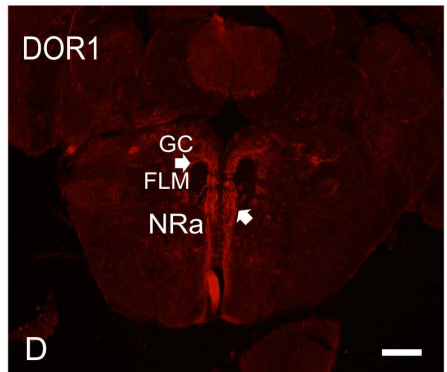
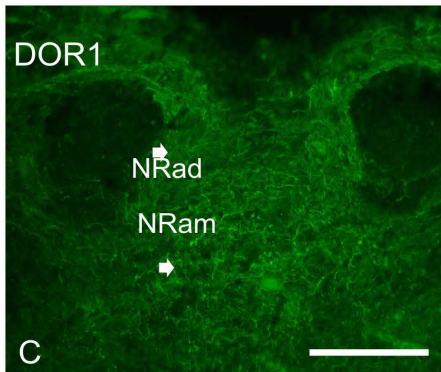
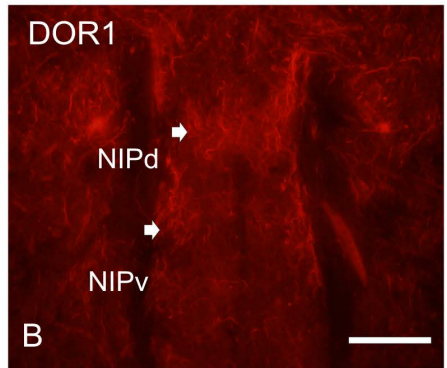
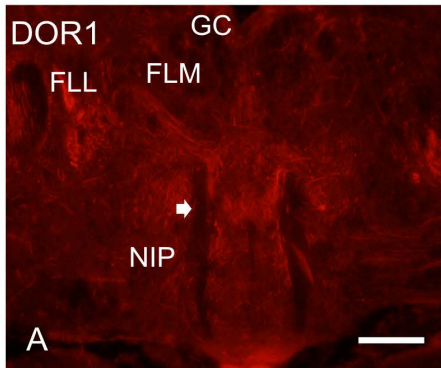
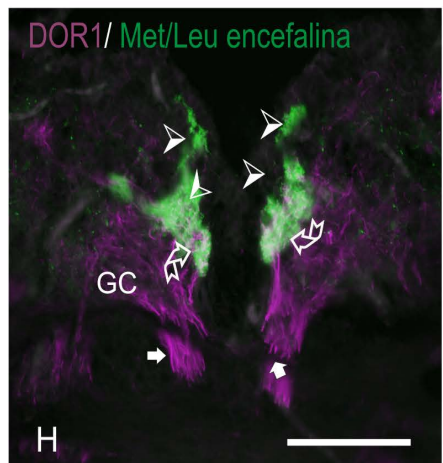
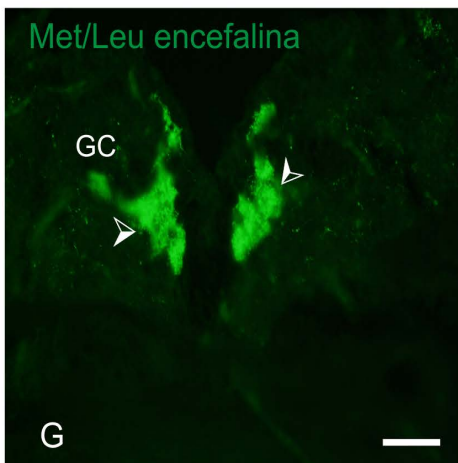
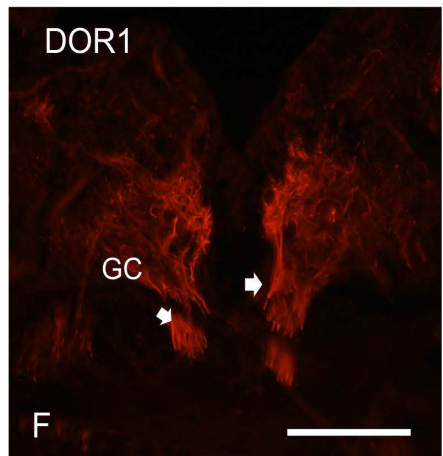
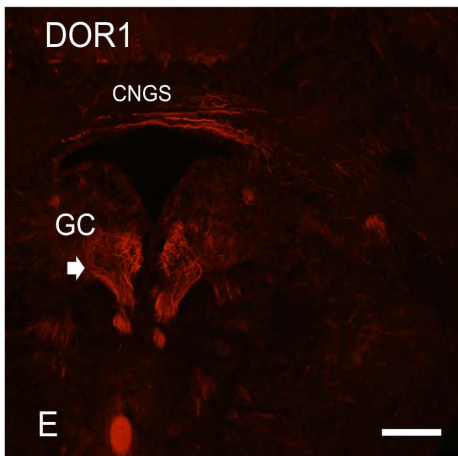
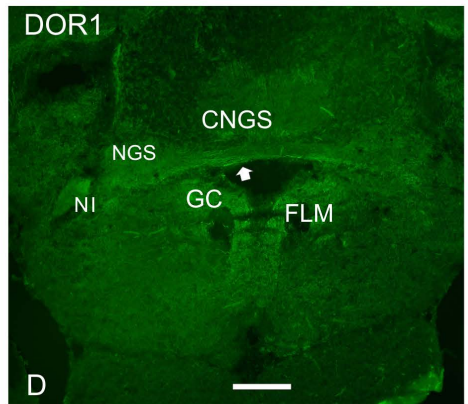
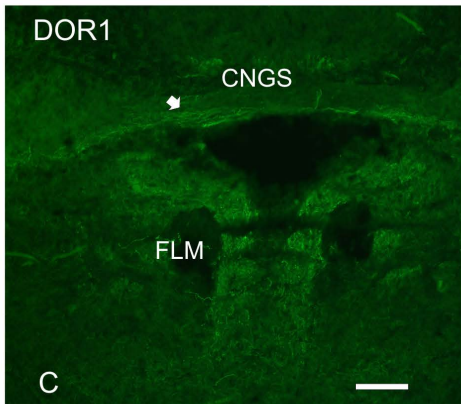
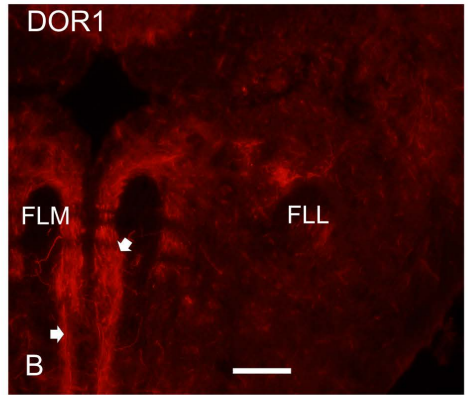
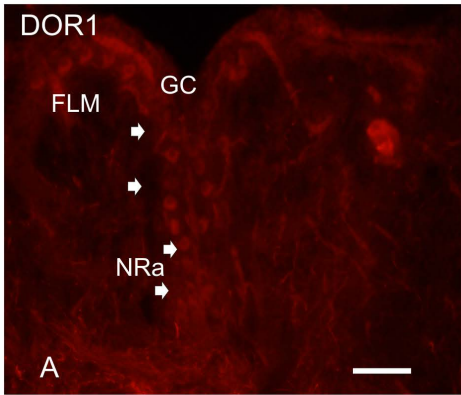


Fig. 21 continuación. Microfotografías de: secciones transversales de la región del rombencéfalo rostral del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (E-F) y Met/Leu encefalina (G), y doble inmunofluorescencia para DOR1 y Met/Leu encefalina (H). E-F, fibras inmunorreactivas a DOR1 en gris central (flechas). G, fibras inmunorreactivas a Met/Leu encefalina en gris central (punta de flecha). G, inmunofluorescencia doble para DOR1 y Met/Leu encefalina (DOR1, flecha; Met/Leu encefalina, punta de flecha; colocalización entre DOR1 y Met/Leu encefalina, flechas curvas). Barras de escala: E: 40 μm (E); F: 50 μm (F); G: 20 μm (G); H: 50 μm (H).



98 *Resultados*

Fig. 22. Microfotografías de secciones transversales de regiones del rombéncefalo del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (A-D). A, cuerpos neuronales inmunorreactivos a DOR1 en gris central y núcleo del rafe (flechas). B, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo del rafe (flechas). C, fibras inmunorreactivas a DOR1 en la comisura del núcleo gustatorio secundario (flechas). D, imagen panorámica mostrando fibras inmunorreactividad a DOR1 en la comisura del núcleo gustatorio secundario (flecha) y gris central. Barras de escala: A-B: 25 μm (A-B); C: 45 μm (C); D: 100 μm (D).



2.10 Región octavolateral

La columna octavolateral consiste en varios núcleos octavales (magnocelular, tangencial, medial y descendente) localizados ventrolateralmente en esta región, y el núcleo de la línea lateral (*nucleus medialis*) cubierto dorsalmente por la cresta cerebelar. Células octavales de tamaño medio y grande situadas a nivel de la entrada del nervio octavo muestran una moderada inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 23A). Células del *nucleus medialis* también presentan DOR1u ir. En la cresta cerebelar, se pueden observar algunos procesos DOR1u ir, probablemente dendritas de las células de la cresta.

En la formación reticular intermedia, algunas neuronas reticulares de las poblaciones lateral, ventrolateral y medial también muestran inmunorreactividad a DOR1 (Fig. 23B, C) . Estas neuronas (de tamaño mediu grande) se disponen en una localización intermedia y medial, lateralmente al fascículo longitudinal medial, mostrando su pericarion una inmunorreactividad de apariencia granular. El fascículo longitudinal medial muestra solo unas pocas fibras DOR1u ir cruzando entre las fibras negativas de este fascículo.

Interesantemente, los dos grandes axones de Mauthner muestran numerosos gránulos DOR1u ir en el axoplasma (Fig. 23C).

2.11 Lóbulos viscerosensoriales , núcleo comisural y área postrema

El lóbulo vagal contiene numerosas neuronas DOR1---ir de pequeño tamaño en la capa celular periventricular, así como fibras y terminales en regiones de neuropilo más profundas. En la región reticular lateral, justo debajo del lóbulo, también pueden apreciarse conspicuas fibras DOR1-ir. Desde esta región, las fibras cursan en la comisura localizada entre las partes dorsal y ventral del fascículo longitudinal medial (Fig. 23D, E). Fibras DOR1u ir acompañan el límite ventral del grueso tracto visceral/gustatorio secundario (Fig. 23F). La raíz descendente del nervio trigémino, la cual se encuentra encima del tracto gustatorio secundario, no muestra inmunorreactividad a DOR1.

Fig. 23. Microfotografías de secciones transversales de los lóbulos viscerosensoriales núcleo comisural y área postrema del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (Au C). A, fibras inmunorreactivas a DOR1 en la región del nervio octaval. B, cuerpos celulares inmunorreactivos a DOR1 en el núcleo medial (flechas). C, inmunorreactividad positiva a DOR1 en los axones de Mauthner (flechas). Barras de escala: 80 μm (A); 15 μm (B); 15 μm (C).

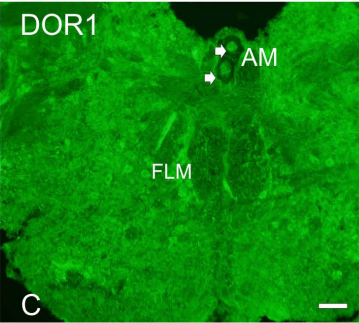
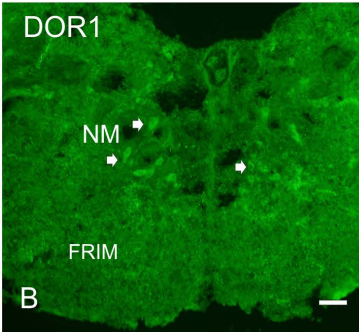
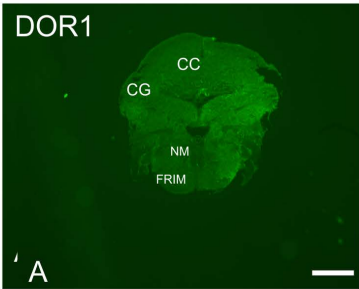
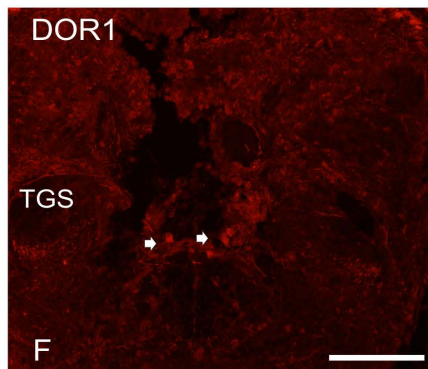
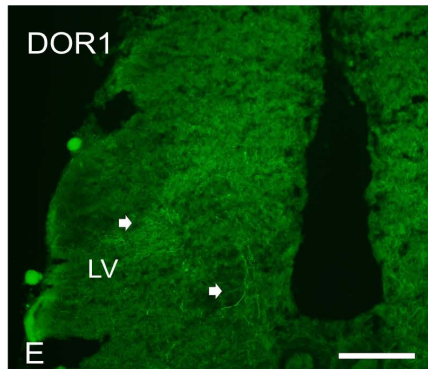
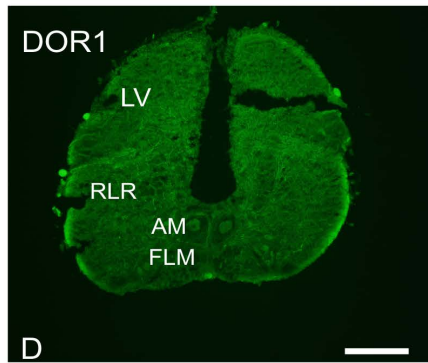


Fig. 23 continuación: Microfotografías de secciones transversales de los lóbulos viscerosensoriales, núcleo comisural y área postrema del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (D-F). D, imagen panorámica de la región del lóbulo fácial. E, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el lóbulo vagal (flechas), F, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el tracto gustatorio visceral (flechas). Barras de escala: 100 μm (D); 60 μm (E); 40 μm (F).



2.12 Región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal

En la región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal, y dorsalmente al canal central, se pueden observar un gran número de fibras DOR1-ir, algunas de las cuales se extienden lateralmente. Esta región se corresponde con el núcleo comisural de Cajal y/o el núcleo funicular medial (Fig. 24A, B). Fibras intensamente DOR1-ir de esta región cursan ventromedialmente para formar una conspicua comisura en el medio del fascículo longitudinal medial. También se aprecia inmunorreactividad a DOR1 en motoneuronas del asta ventral (Fig. 24C, F) y nervio espino-occipital (Fig. 23D), así como en unas pocas células tipo líquido cerebroespinal contactantes en la pared ventral del canal medular.

Las neuronas motoras del asta ventral de la médula espinal del pez cebra también expresan calretinina (proteína ligante de calcio de gran utilidad como marcador en la caracterización de numerosos centros nerviosos, vías y subpoblaciones neuronales de vertebrados). Mediante doble inmunofluorescencia se pudo evidenciar que las células calretinina inmunorreactivas (Fig. 24D, G), también expresan DOR1 (Fig. 24E, H, I). Sin embargo, la implicación funcional de esta proteína citosólica en el sistema opioide mediado por DOR1 no ha sido analizado en el presente trabajo.

Fig. 24. Microfotografías de secciones transversales de la región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1 (A-C) y a calretinina (D), y doble inmunofluorescencia a DOR1 y calretinina (E). A-B, fibras inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo comisural del cajal (flechas). C, motoneuronas inmunorreactivas a DOR1 en el asta ventral de la médula espinal (flechas). D, motoneuronas inmunorreactivas a calretinina en el asta ventral de la médula espinal. E, inmunofluorescencia doble para DOR1 y calretinina (DOR1, flechas; calretinina, punta de flecha; colocalización entre DOR1 y calretinina, flechas curvas). Barras de escala: 30 μm (A); 15 μm (B); 20 μm (C-E).

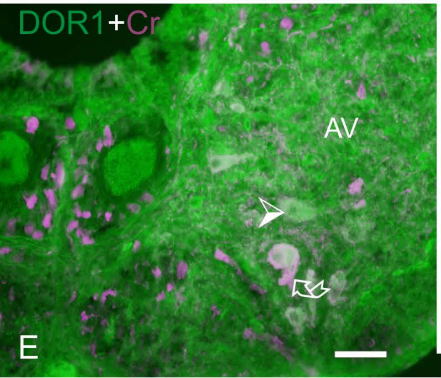
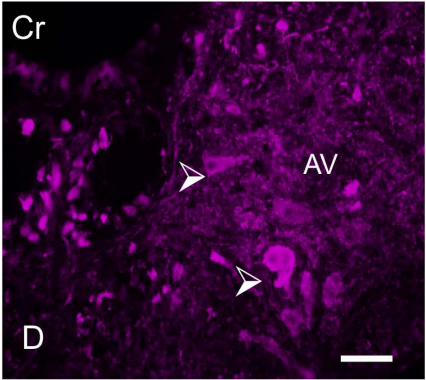
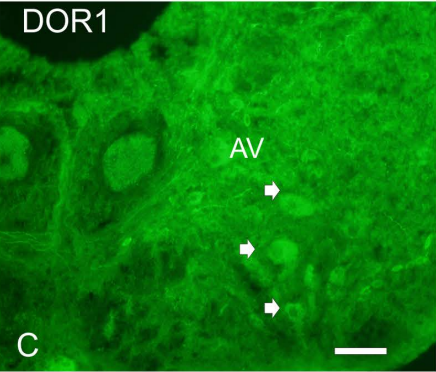
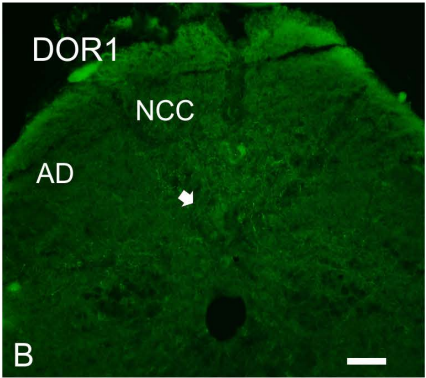
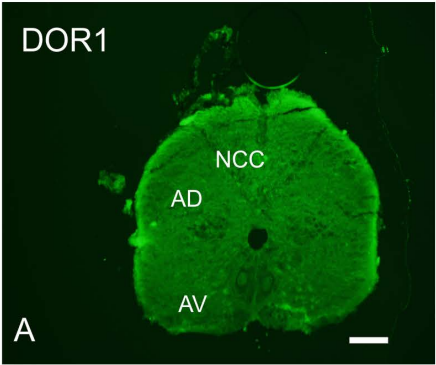
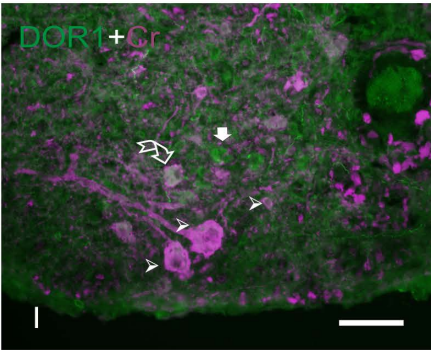
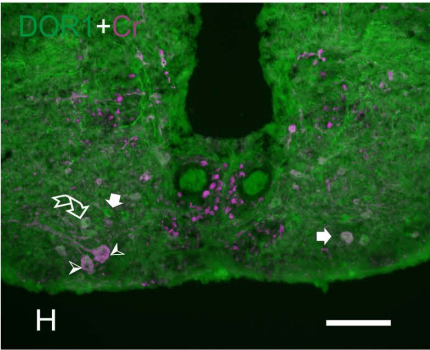
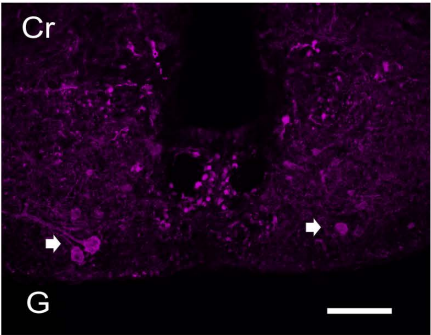
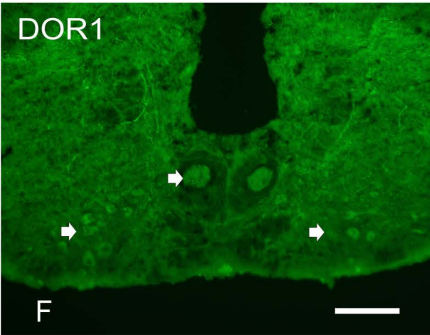


Fig. 24 continuación. Microfotografías de secciones transversales de la región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal del pez cebra adulto, mostrando inmunorreactividad a DOR1(F) y a calretinina (G), y doble inmunofluorescencia para DOR1 y calretinina (H-I). F, cuerpos neuronales inmunorreactivos a DOR1 en el asta ventral de la médula espinal (flechas). G, cuerpos neuronales inmunorreactivos a calretinina en el asta ventral de la médula espinal (punta de flechas). H-I, inmunofluorescencia doble para DOR1 y calretinina (DOR1, flechas; calretinina, puntas de flechas; colocalización entre DOR1 y calretinina, flechas curvas). Barras de escala: 50 μm (F-H); 25 μm (I).





DISCUSIÓN

1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Los receptores opioides están altamente distribuidos tanto en el sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal) como en el sistema nervioso periférico (Janecka y col., 2004; Waldhoer y col., 2004). El receptor opioide delta, al igual que el resto de receptores opioides, pertenece a la superfamilia de proteínas G acopladas a la membrana (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992). A diferencia de lo que sucede en la mayoría de los vertebrados, la presencia de dos genes que codifican receptores opioides delta (DOR1 y DOR2) en el pez cebra parece ser el resultado de una duplicación genómica extra ocurrida en la evolución temprana de los peces de aletas radiadas (Pinal-Seoane y col., 2006; Dreborg y col. 2008). Estudios posteriores permitieron caracterizar otro receptor opioide delta en el pez cebra, denominado ZFOR4. Éste resulta ser un duplicado de ZFOR1, mostrando una gran similitud de secuencia con otros receptores opioides delta, incluido ZFOR1. Estudios realizados mediante hibridación *in situ* revelaron la existencia de neuronas que expresan los ARNm de DOR1, DOR2 y DOR4 en el cerebro del pez cebra (Barrallo y col., 1999; Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006), habiéndose detectado los mayores niveles de expresión en áreas telencefálicas dorsales, en el estrato periventricular de del techo óptico y en la capa granular del cerebelo, principalmente. El presente trabajo constituye el primer estudio relativo a la localización del receptor opioide delta en el cerebro del pez cebra adulto usando un anticuerpo para la proteína DOR1. Mientras que los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* para DOR revelan únicamente cuerpos celulares (Porteros y col., 1999), el empleo de anticuerpos contra DOR1 revela principalmente axones y otros procesos celulares, complementando y ampliando de esta manera los

resultados obtenidos mediante hibridación *in situ*. La inmunorreactividad a DOR1 de los procesos axonales en el pez cebra es similar a la descrita inmunohistoquímicamente en rata y ratón (Arvidsson y col., 1995; Bausch y col., 1995). Sólo en algunas regiones de cerebro (por ejemplo en regiones reticulares de la médula y del mesencéfalo) aparecen cuerpos celulares suficientemente bien inmunomarcados para poder ser comparados con las células que expresan el mensajero de DOR1. Inmunohistoquímicamente para DOR1 en el pez cebra también revela tractos de fibras (es decir, el conectoma del sistema opioide), aunque el origen y destino particular de estas fibras DOR1-ir observadas precisa de futuros estudios.

Doble inmunohistoquímica para DOR1 y Met/Leu encefalina ha revelado que este ligando endógeno de DOR1, no es generalmente expresado por estructuras DOR1. Ambos sistemas aparecen claramente diferenciados, aunque las fibras de ambos tipos coexisten en muchas regiones del cerebro. Esto apoya la implicación de opioides endógenos en la función de aquellas regiones del cerebro que contienen fibras DOR1-ir.

2. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DEL RECEPTOR OPIOIDE DELTA, DOR

2.1 Sistema olfativo

Estudios de hibridación *in situ* revelan que tanto el bulbo olfatorio como la región palial Dp, principal diana de proyecciones olfativas secundarias, contienen neuronas DOR1-positivas en el pez cebra (Porteros y col., 1999). Dado el pequeño tamaño de las células reconocidas en el bulbo olfatorio (Porteros y col., 1999), probablemente éstas se correspondan con interneuronas locales (células grano), más que con neuronas de proyección. Estudios con trazadores han revelado numerosas neuronas bulbopetas en Dp de trucha (Folgueira y col., 2004b) y pez cebra (Gayoso y col., 2011). Es

probable entonces que las fibras DOR1-ir observadas en el tracto olfatorio lateral se correspondan con fibras centrífugas. Dp contiene escasas fibras DOR1-ir, lo que concuerda con la hipótesis de que estas neuronas constituyen la principal fuente de innervación DOR1-ir observada en el bulbo olfatorio del pez cebra.

Además, el patrón de innervación por fibras DOR1-ir del bulbo olfatorio es compatible con la innervación centrífuga del bulbo de la trucha arcoíris por fibras marcadas tras la aplicación del trazador lipófilo Dil en la parte posterior del área telencefálica dorsal (Folgueira y col., 2004). Este patrón es similar a la distribución de fibras DOR1-ir observada en el bulbo olfatorio del ratón y a la distribución de receptores apreciada en experimentos de unión de radioligandos (Bausch y col., 1995). La proyección centrífuga DOR1-ir observada en el presente estudio podría estar implicada en la modulación de la actividad del bulbo por opioides endógenos.

Estudios realizados en individuos juveniles de pez cebra (resultados no incluidos en la presente tesis) pusieron de manifiesto la existencia de una gran cantidad de fibras DOR1-ir en los bulbos olfatorios, así como células receptoras DOR1-ir en las rosetas olfativas. La densidad de fibras observadas en los individuos juveniles es mayor que la observada en ejemplares adultos de pez cebra.

En roedores, tanto el bulbo olfatorio como el telencéfalo (estriado, hipocampo) muestran altos niveles del ARNm de DOR1 (Mansour y col., 1994; Bausch y col., 1995; Búzas y Cox, 1997), algo similar a lo observado en el pez cebra (Porteros y col., 1999). Sin embargo, en el bulbo olfatorio de rata, el

transcrito de DOR es expresado tanto por células grano como mitrales (Bausch y col., 1995).

En humanos existe positividad a DOR-1 en el sistema olfativo. La posible implicación del receptor opioide delta en el control de la respiración fue observada en lampreas adultas. Los estudios realizados sugieren que los receptores delta podrían inducir una depresión de la actividad respiratoria de la lamprea, evidenciando que, al menos en la lamprea estos receptores están presentes en las vías implicadas en la respiración (Mutolo y col., 2007). Algo similar se ha observado en mamíferos, demostrando estudios realizados en ratas neonatas (Ballanyi, y col. 1997), que los receptores opioides tienen efectos depresores sobre la respiración y parece que esto puede ocurrir como resultado de la activación de receptores opioides dentro del tronco cerebral (Yeadon y Kitchen, 1989; Bianchi y col., 1995; Haji y col., 2000; Feldman y Del Negro, 2006). Por otro lado, estudios realizados en mamíferos adultos muestran que agonistas del receptor opioide delta producen un descenso de las actividades de las neuronas implicadas en la respiración dentro de los bulbos y el núcleo pontino (Denavit-Saubié y col., 1978; Morin-Suron y col., 1894; Lalley, 2003; Lonergan y col., 2003).

2.2 Telencéfalo: hemisferios cerebrales.

Las distintas regiones paliales del pez cebra contienen células en las que se ha podido detectar el ARNm del homólogo del pez cebra del receptor opioide delta-ZFOR1 (Porteros y col., 1999), si bien inmunohistoquímicamente solo se han apreciado células tenuamente inmunorreactivas a DOR1 en la porción periventricular de Dm. Esta región palial de peces teleósteos (Dm) se ha propuesto como homóloga de la amígdala de mamíferos, en la cual se han detectado células que expresan el transcrito de DOR humano (Simonin y col., 1994). Lesiones en Dm así como la ablación de los lóbulos telencefálicos

afecta a la adquisición de la aversión gustativa en el carpín dorado (Martín y col., 2011), poniendo de manifiesto que el palio dorsomedial de teleósteos es un componente esencial del sistema de memoria a la adversión gustativa (telencéfalo dependiente), si bien la implicación del receptor opioide delta en este sistema no ha sido estudiada. Por otro lado, estudios sobre las funciones de este receptor en el *pallium* de rata y ratón, demostraron que en estas especies está implicado en funciones de reforzamiento de la alimentación y también parece estar implicado con el abuso a drogas (Merrer y col., 2009).

El subpalio del pez cebra puede considerarse homólogo al estriado, septum y algunas regiones amigdalares de vertebrados terrestres. Estudios mediante hibridación *in situ* para DOR1 y DOR2 no permiten diferenciar entre regiones en el subpalio del pez cebra. En mamíferos, el estriado y la amígdala central muestran una amplia expresión de DOR (Simonin y col. 1994; Bausch y col., 1995; Peckys y Landwehrmeyer, 1999; Smith y col., 1999; Peng y col., 2012; Chung y col., 2015). En este sentido, el gran número de procesos DOR1-ir observados en algunas regiones subpaliales del pez cebra parece sugerir una expresión conservada. A diferencia del palio, el subpalio del pez cebra recibe un gran número de fibras encefalina-ir, compatible con la sensibilidad del receptor opioide delta a las encefalinas (Pinal-Seoane y col., 2006) y sugiriendo una implicación de la encefalina en funciones premotoras y comportamentales de esta región telencefálica.

2.3 Región preóptica, hipotálamo y tubérculo posterior

En la región preóptica del pez cebra se ha observado un gran número de fibras positivas a DOR1 en los fascículos telencefálicos lateral y medial, así como neuronas marcadas débilmente en el núcleo preóptico parvocelular anterior. Estos resultados recuerdan a los obtenidos para ZFOR1 (Porteros y col., 1999) donde se aprecian células que expresan el transcrito del receptor delta en las proximidades del ventrículo. El uso de ZFOR4 muestra una alta densidad de este receptor en el área preóptica, existiendo expresión positiva en la parte anterior del núcleo preóptico parvocelular (Pinal-Seoane y col., 2006), de manera similar a lo observado para ZFOR1. En otro teleósteo como es la carpa (Chadzinska y col., 2009) también ha sido descrita la expresión del receptor opioide delta en la región del núcleo preóptico. El núcleo preóptico parvocelular proyecta a distintos núcleos y regiones del encéfalo de peces teleósteos (Folgueira y col., 2004; Rink y Wullimann, 2004), incluidos los núcleos subpaliales Vv y Vd, y distintas zonas del palio, en las cuales se pueden apreciar en el pez cebra fibras DOR1-ir.

En la rata también se observó positividad a este receptor en numerosos cuerpos celulares el área preóptica, concretamente en el área preóptica lateral y medial, incuidas neuronas del núcleo magnocelular (Cahill y col., 2001).

Parece por lo tanto que el receptor opioide delta puede estar implicado también en el procesamiento de la información visual, ya que se ha demostrado la existencia de este receptor en estructuras relacionadas con la integración de este tipo de información sensorial (Erbs y col., 2014) .

Hipotálamo y tubérculo posterior

El hipotálamo es una de las regiones del cerebro del pez cebra con mayor número de neuronas que expresan DOR1 (Porteros y col., 1998; Pinal-Seoane y col., 2006). Esto contrasta con los bajos o indetectables niveles de expresión de DOR1 observados en el hipotálamo de la rata (Mansour y col., 1994; 1995). Los resultados de este trabajo revelan la existencia de una gran población de células de tipo líquido cerebroespinal contactantes DOR1-ir en los órganos paraventricular, receso lateral y receso posterior, los cuales se corresponden parcialmente con la población observada en la región periventricular mediante hibridación *in situ* (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006). Asimismo, cabe destacar la presencia de un gran número de procesos DOR1-ir en las regiones mediales del hipotálamo tuberal y caudal, pero no en otras regiones del hipotálamo, sugiriendo una implicación diferencial en las vías encefalinérgicas. Como se ha destacado en *Poecilia (guppy)*: Batten y col., 1990), las neuronas que expresan encefalina se localizan principalmente en el núcleo preóptico y el receso lateral, siendo muy numerosas las fibras en el hipotálamo y tubérculo posterior.

Fibras DOR1-ir que van desde el tegmento mesencefálico hacia la región caudomedial del lóbulo hipotalámico terminando aparentemente en el neuropilo del lóbulo hipotalámico posterior. Existen neuronas positivas dentro de la parte periventricular y de los núcleos migrados del tubérculo posterior (Barrallo y col., 1998). Esto concuerda con nuestros resultados donde se observaron cuerpos celulares DOR1-ir núcleo del tubérculo posterior.

A diferencia de lo observado en nuestros resultados, donde solo se observó expresión positiva a DOR1 en regiones mediales y caudales del hipotálamo, mediante hibridación *in situ* se reveló positividad de ZFOR1 por todas las regiones del hipotálamo, existiendo una alta densidad de células en el hipotálamo dorsal cerca del epéndimo y en los núcleos del lóbulo inferior (Porteros y col., 1999).

El receptor ZFO4, al igual que ZFOR1, muestra expresión positiva en núcleos del lóbulo hipotalámico inferior y en la región periventricular del receso lateral (Pinal-Seoane y col., 2006), estos datos concuerdan con los resultados de este trabajo, en los cuales también se observó positividad a este receptor en estas regiones. La expresión en estas dos zonas puede estar relacionada con la modulación opioide de actividades visuomotoras afines con la captura de presas y respuestas de alimentación en el cerebro del pez cebra (Pinal-Seoane y col., 2006). A diferencia de lo observado mediante hibridación *in situ*, en el pez cebra, y en nuestros resultados no se observó expresión positiva a DOR en la región del tubérculo posterior ni en rata (Cahill y col., 2001), ni en ratón (Bausch y col., 1995), ni en humanos (Peckys y Landwehrmeyer, 1999).

El receptor opioide delta en peces, está implicado en la modulación de la liberación de hormonas en el eje hipotalámico-hipofisario, en cambio en mamíferos parece que la implicación de este receptor en dicha modulación tiene una menor importancia (Mansour y col., 1993). La expresión de receptores opiodes delta en regiones neuroendocrinas del pez cebra, incluyendo la región preóptica y el hipotálamo, pone de manifiesto que es probable que participen en el control de GnRH y en la liberación de la hormona luteinizante (LH) (Pinal-Seoane y col., 2006). Se ha demostrado recientemente la presencia y distribución del receptor opioide delta en un

subconjunto de neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo de ratón (Pimpinelli y col., 2006). Estudios realizados mediante hibridación *in situ* en el pez cebra, donde se demostró la existencia de expresión positiva en estas regiones para ZFOR1 (Porteros y col., 1999) y ZFOR4 (Pinal-Seoane y col., 2006), parece dar sustento a la teoría de que los receptores opioides delta están implicados en la modulación de la liberación de hormonas pertenecientes al eje hipotálamo-hipofisario (Mansour y col., 1993).

La moderada expresión de ZFOR4 en el pretecho y en el tubérculo posterior, los cuales son centros integradores de funciones sensoriomotoras muy bien desarrollados en peces teleósteos (Meek y Nieuwenhuys, 1998), sugiere que el sistema opioide podría estar influenciado, al menos en vertebrados inferiores, por mecanismos de adaptación relacionados con respuestas básicas del comportamiento para la supervivencia del animal (Pinal-Seoane y col., 2006).

En vertebrados pueden apreciarse notables diferencias en relación a la expresión de DOR a nivel hipotalámico. Mientras que en humanos no se ha detectado expresión alguna en esta región (Peckys y Landwehrmeyer, 1999), en la rata dicha expresión es extensa y muy intensa, detectándose células inmunorreactivas en el núcleo hipotalámico periventricular, núcleo hipotalámico anterior, en el área hipotalámica lateral, núcleo ventromedial hipotalámico, núcleo tuberomamilar ventral y núcleo lateral mamilar (Cahill y col., 2001). En términos generales, existe una mayor expresión de DOR en el hipotálamo de vertebrados superiores que en el de peces. Los estudios realizados en roedores, rata y ratón, demostraron que el receptor delta, en el hipotálamo aparece estar implicado en procesos relacionados con la

alimentación, el comportamiento sexual y la dependencia a drogas (Merrer y col., 2009).

2.4 Epitálamo

Habénula y fascículo retroflexo.

Existe una gran expresión células marcadas con ZFOR1 en la habénula (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006), aunque su distribución no ha sido estudiada en detalle. La expresión de DOR1 no ha sido descrita en la habénula de rata, ya sea en el núcleo medial o en núcleo lateral (Mansour y col., 1994). Nuestros resultados revelan una distribución diferencial de células y fibras DOR1-ir tanto en el núcleo habenular ventral como en el núcleo habenular dorsal, indicando que el sistema de conducción del prosencéfalo dorsal está especializado en relación a la innervación opioide. En el pez cebra, la porción ventral de la habénula contiene neuronas débilmente inmunorreactivas a DOR1, conteniendo la región habenular dorsal un gran número de fibras las cuales pueden seguirse hacia el fascículo retroflexo. Numerosas fibras DOR1-ir cursan hacia el núcleo interpeduncular ocupando una localización periférica en el fascículo retroflexo, indicando así segregación de diferentes tipos funcionales de fibras en este fascículo. Por otro lado, las fibras encefalinérgicas presentan una distribución diferencial en la habenula del pez cebra, principalmente en regiones ventromediales con escasa inmunorreactividad a DOR1, siendo mucho más abundantes en regiones talámicas las cuales exhiben una inmunorreactividad a DOR1 menor a la presentada en el epitálamo.

Nuestros resultados demuestran la existencia de neuronas DOR1-ir en la glándula pineal y fibras DOR1-1 en el tracto pineal, algo no mencionado en estudios previos. En ratones también se observó una alta expresión para

DOR1 en la glándula pineal (Bzdega y col., 1993), carente de barrera hematoencefálica. Las β -endorfinas parecen regular la actividad termoregulatoria de la carpa vía órgano pineal (Kavaliers, 1982). Así mismo la glándula pineal actúa como un fotorreceptor que permite regular la actividad circadiana, regulando el ciclo de día-noche. Parece estar involucrada, en todos los vertebrados, en la regulación de los comportamientos rítmicos y repuestas fisiológicas a través de la secreción de ciertas hormonas, en este caso de la melatonina (Bianco y Wilson, 2009). Por tanto podríamos llegar a pensar que la existencia de neuronas DOR1-ir en la glándula pineal, relaciona a este receptor con el control del ciclo circadiano en el pez cebra. Si las encefalinas o otros opoides (de origen central o periférico) también afectan a la actividad de la glándula pineal en el pez cebra se desconoce. Estudios previos han demostrado que existe una conexión entre la glándula pineal, la habénula y el núcleo interpeduncular. Estando la conexión de la glándula pineal hacia el núcleo interpeduncular muy estudiada en el pez cebra (Kuan y col., 2007). Dicha conexión parece estar implicada en los ritmos biológicos de los individuos (permitiéndoles reconocer si es día o noche) y en el control del estrés (Jesuthasan, 2011). Así mismo, en base a nuestros resultados, donde además de positividad al receptor delta en la glándula pineal, existe expresión del receptor en la habénula y en el núcleo interpeduncular, se podría sugerir que cuerpos celulares presentes en la glándula pineal emiten proyecciones hacia la habénula y esta a su vez las emite hacia el núcleo interpeduncular, suponiendo así que el receptor opioide delta está implicado en los ritmos biológicos del pez cebra y también en el control de las respuestas ante situaciones de estrés.

Existe también una conexión recíproca y directa entre la habénula y el núcleo del rafe, puesto que el núcleo del rafe está implicado en la regulación del sueño y que la habénula recibe proyecciones de la glándula pineal, se puede suponer que esta es una vía para la regulación del sueño relacionada con los ciclos circadianos. Al existir una gran cantidad de fibras DOR1-ir en estas estructuras se puede sugerir que el receptor DOR1 está también implicado en la regulación del sueño. Además de la vía directa, habénula- núcleo del rafe relacionada con el control del sueño, la vía entre la habénula y el núcleo interpeduncular participa también en el control del sueño (Bianco y Wilson, 2009), se cree que ambas vías, son importantes no solo para la regulación del sueño si no también para su normal duración. Por tanto parece que la presencia del receptor opioide delta en la habénula, el núcleo interpeduncular y el núcleo del rafe está relacionada con la participación de este receptor en el control del sueño.

2.5 Tálamo y pretálamo

La región talámica del pez cebra presenta únicamente algunas fibras DOR1-ir. En el núcleo talámico dorsal, bajo la comisura posterior, se observó un pequeño y grupo compacto de fibras inmunorreactivas. Por el contrario, resultados obtenidos en esta misma especie revelan la presencia de neuronas que expresan el ARNm de ZFOR1 en el núcleo talámico anterior, núcleo posterior dorsal y en el núcleo posterior central (Porteros y col., 1999). En este mismo estudio, también se observan neuronas marcadas en el tálamo ventral, así como pequeñas células localizadas en las proximidades del ventrículo diencefálico a nivel de los núcleos talámicos ventrolateral y ventromedial (Porteros y col., 1999). La expresión observada para ZFOR4 es similar a la presentada por ZFOR1 (Pinal-Seoane y col. 2006).

En ratón (Bausch y col., 1995) y en rata (Cahill y col., 2001) también se han observado células positivas en la región talámica. En la rata, se observaron células inmunorreactivas al receptor opioide delta en los grupos talámicos laterales, incluidos el anterodorsal, anteroventral, periventricular, mediodorsal, ventromedial, ventrolateral, ventroposterior, laterodorsal y núcleo talámico parafascicular. La expresión observada en el núcleo talámico ventromedial y ventrolateral en rata (Cahill y col., 2001) es la misma que la observada en el pez cebra para ZFOR1 (Porteros y col., 1999). A diferencia de lo observado en rata y ratón, en humanos, al igual que en el pez cebra (presentes resultados), no se observaron cuerpos neuronales DOR1-ir en esta región (Peckys y Landwerh Meyer, 1999).

2.6 Techo óptico, toro longitudinal, toro semicircular y tegmento

Estudios de hibridación *in situ* revelaron la presencia de números cuerpos celulares que expresan DOR1a y DOR1b en el estrato periventricular y también dispersos en capas más superficiales (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006). Nuestros resultados también revelaron la presencia de células DOR1-ir en el estrato periventricular, siendo más escasas en otras capas del techo óptico. En cambio, un gran número de procesos celulares son inmunorreactivos a DOR1. Estos procesos muestra una distribución en delgadas subláminas paralelas a la superficie, además hay procesos que recorren perpendicularmente a las otras capas, en concordancia con la estructura en capas del techo óptico. La capa marginal, la capa de tipo molecular más superficial del techo que sólo se encuentra en peces teleósteos, también contiene procesos DOR1-ir. La presencia de células y procesos DOR1-ir en el toro longitudinal, fuente de fibras paralelas en la capa marginal de

teleósteos (Folgueira y col. 2007), sugiere que algunas de las fibras son toro-tectales, pero el origen no está claro del todo. La expresión del receptor opioide delta en el toro longitudinal y en regiones magnocelulares y parvocelulares, las cuales son regiones de integración visual, refuerza la hipótesis de que los receptores opioide delta participan en las vías sensoriales (Atweh y Kuhar, 1983). Una organización laminar de cuerpos celulares que expresan el transcrito para DOR1 fue también descrita en el colículo superior de rata (Mansour y col., 1994), aunque la organización de sus procesos no está descrita.

Mediante hibridación *in situ*, se demostró la existencia de ZFOR1 en células de la capa periventricular del techo óptico, lo cual concuerda con nuestros resultados, esto mismo se observó en el torus semicircularis donde existe expresión positiva al receptor opioide delta en la región central y ventrolateral del mismo. Dentro del tegmento mesencefálico, existe expresión de ZFOR1 en el núcleo tegmental dorsal y el rostral, cercano al toro semicircular y en la formación reticular superior (Porteros y col., 1999).

Con ZFOR4 se observó una expresión similar a la de ZFOR1, apreciándose una abundante expresión tanto en el techo óptico como en el torus semicircularis; en cambio la expresión de ZFOR4 es menor a la de ZFOR1 en el tejido mesencefálico (Pinal- Seoane y col., 2006).

En humanos no se observó expresión positiva del receptor delta en regiones mesencefálicas (Peckys y Landwehrmeyer, 1999). Algo similar ocurre en ratones (Bausch col., 1995). En cambio, en rata existe expresión moderada al receptor opioide delta en células de la sustancia negra, núcleo rojo del área ventral tegmental y núcleo oculomotor (Cahill y col., 2001). En este último, también se observaron motoneuronas inmunorreactivas a DOR1 en el pez cebra.

2.7 Cerebelo y válvula cerebelar

En el cerebelo del pez cebra se observó una gran cantidad de expresión a DOR1a y DOR1b, tanto en los pericariones de las células de Purkinje como de las células granulosas, observándose también una gran expresión en las capas de la válvula cerebelar (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006), presentando la rata una expresión similar (Mansour y col., 1994). A pesar de que ZFOR4 presenta un marcaje menos intenso que ZFOR1, la expresión para este marcador es también muy abundante en la válvula cerebelar, *corpus cerebelar* y lóbulo vestibular (Pinal-Seoane y col., 2006). Inmunohistoquímicamente también pudo apreciarse una expresión DOR1 en el cerebelo del pez cebra, revelando principalmente varios tipos de procesos en las capas molecular y granular así como en los pericariones de las células de Purkinje. Numerosos procesos DOR1-ir también fueron observados debajo de la capa de las células de Purkinje, sugiriendo que se corresponden con los axones de las células de Purkinje en contacto con las células eurodendroides (neuronas consideradas homólogas a los núcleos cerebelosos profundos de mamíferos y otros vertebrados). Un plexo basal similar de axones de las células de Purkinje ha sido demostrado con anticuerpos antagonistas a parvalbumina7 (Bae y col., 2009). En el ratón, también se ha descrito inmunohistoquímicamente la presencia de abundantes procesos en la capa de las células de Purkinje y alrededor de los pericariones de los núcleos cerebelosos profundos (Bausch y col., 1995; Abeyta y col., 2002), lo cual indicaría que los patrones de la expresión de DOR se encuentran conservados entre los cerebelos de mamíferos y pez cebra. Curiosamente, el patrón de expresión de DOR observado en el cerebelo humano difiere notablemente al presentado por el resto de especies de vertebrados,

apareciendo marcadas exclusivamente las células de Golgi (Peckys y Landwehrmeyer, 1999). Estas diferencias podrían deberse mas al procesamiento de la muestra o al procesamiento metodológico empleado que a una evolución divergente de este sistema en la especie humana.

Los resultados observados en el cerebelo tanto en mamíferos como en el pez cebra, sugieren que el receptor opioide delta juega un papel importante en esta estructura. Estudios en otro teleósteo como es la carpa dorada, en los cuales se realizó ablación del cerebelo, permitieron apreciar un incremento en la sensibilidad al dolor, sugiriendo así que el cerebelo está implicado en la nocicepción (Porteros y col., 1998). La abundante expresión del receptor opioide delta (ZFOR1) en el cerebelo del pez cebra sugiere que este juega un papel importante en la integración de estímulos y apoya la hipótesis de que los receptores opioides delta juegan un papel en procesos sensoriales (Atewh y Kuhar, 1983).

2.8 Rombencéfalo rostral

Existen numerosas fibras DOR1-ir en el núcleo interpeduncular, las cuales están distribuidas tanto en el neuropilo ventral como en el dorsal, revelando la pobre selectividad exhibida por las fibras DOR1-ir procedentes de la habénula. Esto está probablemente relacionado con la presencia bilateral de células y procesos DOR1-ir en la habénula. La aplicación del trazador lipófilo, DiI, en el núcleo interpeduncular del pez cebra, demostró (resultados no incluidos en este trabajo) que este núcleo proyecta hacia el núcleo de rafe superior, en este trabajo se observó que ambos núcleos tienen fibras DOR1-ir. Este núcleo proyecta también al Gris central, habiéndose observado una proyección similar en vertebrados superiores (Klemm, 2004). Se observaron proyecciones del núcleo interpeduncular, no solo al núcleo del rafe superior, si no también al núcleo del rafe inferior, así como conexiones entre el núcleo

interpeduncular y el lóbulo facial, el cual a su vez, proyecta hacia el núcleo gustatorio secundario (resultados no incluidos en este trabajo). La relación existente entre el núcleo interpeduncular y estos núcleos, todos ellos DOR1-ir, parece sugerir que el núcleo interpeduncular puede ser una región de paso, para las vías que controlan las funciones realizadas por este receptor en otras regiones del encéfalo del pez cebra.

A diferencia de lo observado en este trabajo, el uso de ZFOR1 y ZFOR4, no reveló la existencia de positividad en el núcleo interpeduncular del pez cebra (Porteros y col., 1999; Pinal-Seoane y col., 2006). Esto puede ser debido a la diferente metodología empleada (técnicas inmunohistoquímicas vs. hibridación *in situ*) Por el contrario, los estudios realizados en rata demostraron la expresión del receptor delta en el núcleo interpeduncular, donde se observaron numerosas células marcadas débilmente (Cahill y col., 2001). Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Arvidsson y col., 1995).

Una de las funciones mencionadas del receptor opioide delta es la de participar en la regulación de la producción de neurotransmisores, en relación a esto y conociéndose la existencia de conexiones entre el núcleo interpeduncular y el núcleo del rafe (Klemm, 2004; Jesuthasan, 2011), se cree que el núcleo interpeduncular actúa controlando la producción de serotonina en las neuronas del núcleo del rafe. Observando nuestros resultados, donde se reveló la existencia de fibras DOR1-ir en el núcleo interpeduncular y núcleo del rafe, podríamos llegar a pensar, que en este caso, el receptor opioide delta participa en el control de la regulación de producción de serotonina por parte de neuronas del rafe.

En la región rombencefálica existen otros núcleos que muestran expresión positiva en nuestro trabajo, así se observaron tanto cuerpos neuronales fibras inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo del rafe, estos resultados en el pez cebra recuerdan a las abundantes fibras DOR1-ir observadas en el núcleo del rafe de rata (Arvidsson y col., 1995). Neuronas del núcleo del rafe tienen una expresión débil para ZFOR4 (Pinal-Seoane y col., 2006).

En rata se observó una expresión moderada en el núcleo del rafe *pallidum*, el rafe *obscurus*, rafe *magnus*, rafe *dorsalis* y también en el rafe *medianus* (Cahill y col., 2001). Existe un grupo de neuronas serotoninérgicas situadas en la línea media del complejo del rafe, las cuales reciben innervación DOR1 en la rata (Arvidsson y col., 1995), esto concuerda con algunas neuronas que expresan serotonina y a la vez el transcrito DOR. Es posible, por tanto, que el receptor opioide delta module la secreción de serotonina dentro del núcleo del rafe. Inervación de fibras positivas a DOR1 se observó en áreas noradrenérgicas como el *locus coeruleus*, el cual no presenta inmunoreactividad a DOR1 en el pez cebra (presentes resultados). Los estudios realizados en humanos demuestran que no hay positividad ni en el núcleo del rafe ni en el *locus coeruleus* (Peckys y Landwehrmeyer, 1999).

Los receptores opioides parecen modular la secreción de varios neurotransmisores presinápticos, actuando en algunos casos como inhibidores y en otros como activadores de la secreción (Ronker y Schoffelmeer, 1993). Es posible que el receptor delta funcione como autorreceptor, existen varicosidades que tienen encefalina y DOR en algunas áreas del encéfalo, entre ellas el área *magnus* del rafe, la zona reticular lateral, el núcleo reticular paragigantocelular y en la parte superficial del colículo inferior; esto parece sugerir que el receptor opioide delta no sólo actúa como receptor específico para la Met/Leu encefalina si no que podría modular la

producción de la Met/Leu encefalina en estas regiones. Se observó una coexistencia entre la serotonina y las encefalinas en el núcleo del rafe *pallidum* y el núcleo del rafe *obscurus*, los cuales proyectan al asta ventral de la médula espinal (Millhorn y col., 1989). Esto puede sugerir que la encefalina, a su vez podría modular la producción, a través de la activación del receptor opioide delta, de la serotonina en el asta ventral. Se sugiere que los receptores delta están presentes en aquellas regiones donde llegan aferencias de células serotoninérgicas. Microinyecciones de morfina o péptidos opioides dentro del núcleo del rafe *magnus* producen hipoalgesia (Dickenson y col., 1979; Levy y Proudfit, 1979; Azami y col., 1982; Jensen y Yaksh, 1986), esto sugiere que los receptores opioides delta están implicados en el control de los procesos analgésicos.

Estudios previos sobre el núcleo del rafe (Lillesaar y col., 2011) sugieren que este núcleo está implicado en funciones como la reproducción tanto en el pez cebra como en otras especies de vertebrados, la existencia de fibras DOR1-ir en este núcleo podría apoyar la teoría de que este receptor participa en la regulación de la función reproductiva. Esta función del receptor DOR ha sido demostrada en vertebrados superiores como la rata (Merrer y col., 2009), en esta función parece que también está implicado el hipotálamo. Estudios realizados en el pez cebra parecen indicar que existe una relación entre el hipotálamo y el núcleo del rafe (Lillesaar y col., 2011), ambas regiones muestran expresión positiva a este receptor, por tanto podemos llegar a pensar que el hipotálamo puede enviar proyecciones al núcleo del rafe siendo ésta una posible vía para la regulación de la función reproductiva. En rata se estudiaron las conexiones existentes entre el núcleo del rafe y el hipotálamo poniendo de manifiesto que el hipotálamo participa en el comportamiento

sexual (Nakamura, 2013). Por otro lado, se demostró que el núcleo del rafe parece estar implicado en procesos de recompensa (Azmita y Segal, 1978; Azmita y Gannon, 1986; Molliver, 1987; Vertes, 1991; Peyron y col., 1998; Nakamura, 2013), por tanto, se podría sugerir que existe una implación del receptor opioide delta en procesos de recompensa.

El rombencéfalo más rostral del pez cebra contiene dos núcleos especializados relacionados con el sistema visual y el sistema del gusto, el núcleo del istmo y el núcleo gustatorio secundario, respectivamente (Wullimann y col., 1996; Castro y col., 2006). De estos núcleos, el núcleo del istmo contiene cuerpos celulares que expresan el ARNm de DOR1, aunque débilmente (Porteros y col., 1999). En cambio nuestros resultados apenas mostraron inmunorreactividad a DOR1 en este núcleo ni en la región gustatoria (dorsal) del núcleo gustatorio secundario (Castro y col., 2006b). Sin embargo un gran número de fibras positivas aparecen asociadas con la región visceral general (ventral) del núcleo gustatorio secundario, indicando una especialización de esta región, la cual también recibe fibras encefalínérgicas no presentes en la parte dorsal del núcleo gustatorio secundario ni en el núcleo del istmo. En el núcleo parabránquial de rata, el cual se corresponde parcialmente con el núcleo visceral/gustatorio secundario de teleosteos, se observaron numerosas fibras DOR1-ir (Arvidsson y col., 1995).

2.9 Region octavolateral

Dentro de esta región se observó la existencia células octavales a nivel del nervio octavo moderadamente inmunorreactivas a DOR1. Células del núcleo medial muestran niveles de expresión similares a las del núcleo octaval. A nivel mediolateral y ventrolateral existen poblaciones de células reticulares que presentan inmunorreactividad a DOR1. ZFOR1 se expresa en los núcleos de la región octavolateral: anterior, magnocelular, tangencial, descendente y

núcleo octaval posterior (Porteros y col., 1999). En el núcleo octavolateral medial y en la población secundaria octaval también hay expresión de ZFOR1 (Porteros y col., 1999). ZFOR4 muestra la misma expresión que ZFOR1 en el área octaval, siendo esta más abundante que la de ZFOR1 (Pinal-Seoane y col., 2006).

2.10 Lóbulos facial, vagal y glossofaríngeo, núcleo comisural y área postrema

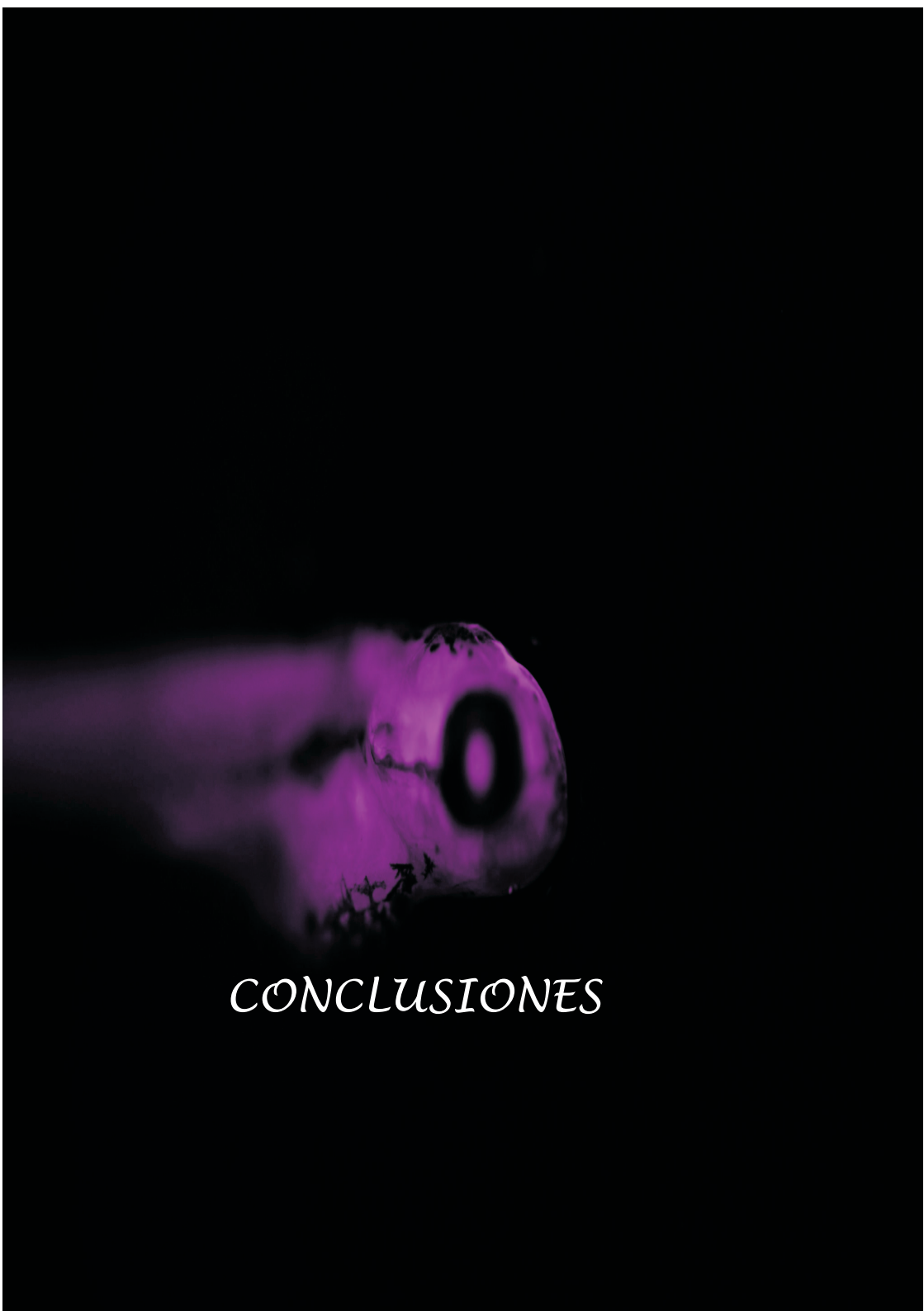
En este trabajo se observaron numerosas neuronas en el lóbulo vagal, así como fibras positivas en el neuropilo. Se observaron abundantes células marcadas moderadamente con ZFOR1 en los lóbulos facial, glossofaríngeo y vagal (Porteros y col., 1999). Con ZFOR4 se observó también positividad en los lóbulos vagal, facial y glossofaríngeo y, al igual que lo observado con ZFOR1, muestran una expresión moderada en estas regiones (Pinal-Seone y col., 2006).

2.11 Región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal

Curiosamente, en el pez cebra se observaron motoneuronas inmunorreactivas a DOR1 en el núcleo oculomotor y troclear, encontrándose ambos núcleos inervados por fibras encefalinérgicas. Aunque no ha sido descrita la expresión de ARNm de DOR1/DOR2 en estos núcleos del pez cebra (Porteros y col., 1999), en el núcleo oculomotor de la rata se ha observado la expresión de los receptores opioides μ y δ (Mansour y col., 1994). Así, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en rata, sugiriendo que DOR1 puede jugar un papel importante en el control del músculo del ojo también en el pez cebra.

Existe inmunorreactividad positiva a DOR1 en la formación reticular inferior, canal central de la médula espinal y un marcaje DOR1-ir débil en motoneuronas del área ventral. Con ZFOR1 se observó expresión moderada en el asta dorsal, cuyos cuerpos neuronales DOR1-ir aparecen localizados en la línea media, y una expresión más abundante en asta ventral de la médula espinal (Porteros y col., 1999). Los resultados obtenidos para ZFOR4 concuerdan con los observados para ZFOR1 (Pinal- Seoane y col., 2006). En el asta dorsal de la médula espinal de rata se observaron cuerpos celulares DOR1-ir marcados moderadamente alrededor del canal central (Cahill y col., 2001). En humanos, no se observa positividad al receptor delta opioide en ninguna región de la médula espinal (Peckys y Landwehrmeyer, 1999). Estudios sobre las funciones del receptor delta demostraron que en la médula espinal, el receptor delta juega un papel como agonista en la antinocicepción (Mika y col., 2001)

Incluso observándose diferencias evolutivas entre el sistema nervioso central de mamíferos y peces (Butler y Hodos, 1996.) existen homologías en algunas regiones, como son: el área dorsal telencefálica y el cortex cerebral de mamíferos, y el ganglio basal y el cerebelo, que nos permiten sugerir que existe una correlación en la distribución de los receptores dentro del encéfalo de vertebrados, pudiendo llegar a establecer una comparación evolutiva de las funciones del receptor delta opioide en mamíferos y peces (Pinal-Seoane y col., 2006).



CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El estudio inmunohistoquímico usando el anticuerpo para el receptor delta opioide, DOR1, puso de manifiesto la existencia de poblaciones neuronales DOR1-ir en: bulbos olfativos, áreas telencéfalias, área preóptica, regiones hipotalámicas, estrato periventricular del techo óptico, gris central, formación reticular superior, núcleo oculomotor, núcleo tróclear, núcleo del rafe, cerebelo, núcleo medial, lóbulo vagal, formación reticular inferior medial y asta ventral de la médula espinal.
2. La expresión observada de fibras inmunorreactivas a DOR1 es mucho más abundante que la observada para cuerpos neuronales, existiendo fibras DOR1-ir por todo el encéfalo del pez cebra, desde las regiones más rostrales del encéfalo, como son los bulbos olfativos, hasta las regiones más caudales del encéfalo, como la médula espinal.
3. En base a los resultados obtenidos mediante el estudio inmunohistoquímico del receptor opioide delta, DOR1, y observando la distribución tanto de cuerpos neuronales como de fibras DOR1-ir, podemos llegar a decir que éste receptor ampliamente distribuido por todo el encefalo adulto del pez cebra.
4. El sistema opioide parece ser un sistema importante dentro del encéfalo del pez cebra, pudiendo participar así en diversas funciones principales (alimentación, comportamiento sexual, estrés, regulación del ciclo circadiano, modulación de la liberación de hormonas, control del dolor) para el supervivencia y el correcto comportamiento del pez cebra.

138 Conclusiones

5. La expresión del ligando específico, para DOR1, Met/Leu encefalina coincide en algunas regiones del encéfalo con la expresión observada para DOR1. Sin embargo, la doble inmunofluorescencia de DOR1 y Met/Leu encefalina ha revelado que este ligando endógeno de DOR1 no es expresado por estructuras DOR1-ir.

6. A pesar de no ser expresadas las dos sustancias por las mismas estructuras, la coexistencia observada entre DOR1 y Met/Leu encefalina apoya la teoría de que los opioides endógenos están implicados en diferentes funciones relacionadas con el receptor opioide delta en diversas regiones del encéfalo.



BIBLIOGRAFÍA

Abeyta A, Dettemer TS, Barnes A, Vega D, Carta M, Gallegos N, Raymond-Stintz M, Savage DD, Valenzuela CF, Saland LC. 2002. Delta opioid receptor localization in the rat cerebellum. *Brain Res* 931: 100-105.

Aboud ME, Noel MA, Farnsworth JS, Tao Q. 1994. Molecular cloning and expression of a delta-opioid receptor from rat brain. *J Neurosci Res* 37: 714-719.

Aizawa H, Amo R, Okamoto H. 2011. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci* 5:138,

Alicea C, Belkowski SM, Sliker JK, Zhu J, Liu-Chen LY, Eisenstein TK, Alder MW, Rogers TJ. 1998. Characterization of kappa-opioid receptor transcripts expressed by T cells and macrophages. *J Neuroimmunol* 91:55-62.

Altman J, Bayer SA. 1997. Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure, and function. CRC Press Inc Boca Raton FL.

Álvarez FA, Rodríguez-Martín I, González-Núñez V, Marrón Fernández de Velasco E, González Sarmiento R, Rodríguez RE. 2006. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett* 405: 94-99.

Amo R, Aizawa H, Takahashi M, Kobayashi M, Takahashi R, Aoki T, Okamoto H. 2010. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. *J Neurosci* 30: 1566-1574.

Arvidsson U, Dado RJ, Riedl M, Lee JH, Law PY, Loh HH, Elde R, Wessendorf MW. 1995. δ Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and

spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. J Neurosci 15: 1215-1235.

Atweh SF, Kuhar MJ. 1983. Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain. Br Med Bull 39: 47-52.

Azami J, Llewelyn MB, Roberts H. 1982. The contribution of nucleus reticularis paraventricularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. Pain 12: 229-246.

Azmita EC, Segal M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and a median raphe nuclei in the rat. J Comp Neurol 179: 641-667.

Azmita EC, Gannon PJ. 1986. The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. Adv Neurol 43: 407-468.

Ballanyi K, Lalley PM, Hoch B, Richter DW. 1997. cAMP-dependent reversal of opioid- and prostaglandin-mediated depression of the isolated respiratory network in newborn rats. J Physiol 504: 127-34.

Bae YK, Skani S, Shimizu T, Tanabe K, Nojima H, Kimura Y, Higashijima S, Hibi M. 2009. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. Dev Biol 330: 406-426.

Bao L, Jin SX, Zhang C, Wang LH, Xu ZZ, Zhang FX, Wang LC, Ning FS, Cai HJ, Guan JS, Xiao HS, Xu ZQD, He C, Hökfelt T, Zhou Z, Zhang X. 2003. Activation of

delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron* 37: 121-133.

Barrallo A, González-Sarmiento R, Porteros A, García-Isidoro M, Rodríguez RE. 1998. Cloning, Molecular Characterization and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from Zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* 245: 544-548.

Barrallo A, González- Sarmiento R, Alvar F, Rodríguez RE. 2000. ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 84: 1-6.

Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 302: 893- 919.

Bausch SB, Patterson TA, Appleyard SM, Chavkin C. 1995. Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain. *J Chem Neuroanat* 8: 175-189.

Becker T, Becker CG, Bernhardt RR, Tongiorgi E, Wullimann MF, Schachner M. 1995. Brain nuclei with axons projecting to the spinal cord in zebrafish: regenerative capacity and regulation of cell adhesion molecules. *Soc Neurosci Abstr* 21: 1279.

Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. 1995. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75: 1-45.

Bergès J, Kamar A, Oliveira P, Pilmé J, Luppi E, Hovée-Levin C. 2015. Toward and understanding of the oxidation process of methionine enkephalin: A combined electrochemistry quantum chemistry and quantum chemical topology analysis. *J Phys Chem B*. 119: 6885-6893.

Bianco IH, Wilson SW. 2009. The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*: 364: 1005-1020.

Bojnik E, Kleczkowska P, Marron Fernandez de Velasco E, Corbani M, Babos F, Lipkowski AW, Magyar A, Benyhe S. 2014. Bioactivity studies on atypical natural opioid hexapeptides processed from proenkephalin (PENK) precursor polypeptides. *Comp Biochem Physiol* 174: 29-35.

Bradbury A, Smyth D, Snell C. 1975. Peptides: chemistry, structure, and biology. In: Walter, R, Meienhorner, J (Eds), *Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium*. Ann Arbor Science, Ann Arbor MI.

Braford MR, Northcutt RG. 1983. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In: Davis R.E., Northcutt R.G. (eds): *Fish Neurobiology*, vol. 2 Higher Brain Areas and Functions. Ann Arbor: University of Michigan Press, pp. 117-140.

Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5391-5393.

Butler AB, Saitel WM. 1991. Retinal projections in the freshwater butterfly fish, *Pantodon buchholzi* (Osteoglossoidei). I. Cytoarchitectonic analysis and primary visual pathways. *Brain Behav Evol*. 38: 127-153.

Butler AB, Hodos W. 1996. Comparative vertebrate neuroanatomy. New York: John Wiley & Sons.

Búzas B, Cox BM. 1997. Quantitative analysis of mu and delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. *Neuroscience* 76: 479-489.

Bzdega T, Chin H, Kim H, Jung H, Kozek CA, Klee WA. 1993. Regional expression and chromosomal localization of the δ opiate receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 9305-9309.

Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D, Beaudet A. 2001. Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labelling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol* 440: 65-84.

Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2006 a. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and comparasion with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes I. Olfactory organ and forebrain. *J Comp Neurol* 494: 435-459.

Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2006 b. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and comparasion with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes II. Midbrain, Hidbrain, and rostral spinal cord. *J Comp Neurol* 494: 792-814.

Chadzinska M, Hermesen T, Savelkoul HFJ, Lidy Verburg-van Kemenade BM. 2009. Cloning of opioid receptors in common carp (*Cyprinus carpio*) and their

involvement in regulation of stress and immune response. *Brain Behav Immun* 23: 257-266.

Chanchonie M, Clairambault P. 1975. Development of the telencephalon of *salmo irideus* Gib. *J Himforsch* 16: 75-89.

Charbogne P, Kieffer BL, Beford K. 2014. 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene Knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76 Pt B 204-217.

Chen T, Li J, Chao D, Sandhu HK, Liao X, Zhao J, Wen G, Xia Y. 2014. δ -Opioid receptor activation reduces α -synuclein overexpression and oligomer formation induced by MPP(+) and/or hypoxia. *Exp Neurol* 255: 127-36.

Cheng Y, Mestek A, Yu L. 1993. Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *Biochem J* 295: 625-628.

Cheng B, Liu HW, Fu XB, Sheng ZY, Li JF. 2008. Coexistence and upregulation of three types of opioid receptors, μ , δ and κ , in human hypertrophic scars. *Br J Dermatol* 158 : 713-720.

Chung PCS, Kieffer BL. 2013. Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Therap* 140: 112-120.

Chung PC, Boehrer A, Stephan A, Matifas A, Scherrer G, Darq E, Befort K, Kieffer BL. 2015. Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC-80 induce seizures. *Behav Brain Res* 278: 429-34.

Chung PCS, Keyworth HL, Martín- García E, Charbogne P, Darcq E, Bailey A, Filliol D, Matifas A, Scherrer G, Ouagazzal AM, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Maldonado R, Kitchen I, Kieffer BL. 2015. A novel anoxigenic role for the delta opioid receptor expressed in GABAergic forebrain neurons. *Biol Psych* 77: 404-415.

Chung PCS, Kieffer BL. 2013. Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Therap* 140: 112-20.

Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E. 1982. Primary structure of the human Met-and Leu- enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295:663-666.

Corujo A, Anadón R. 1990. The development of the diencephalon of the rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) thalamus and hypothalamus. *J Himforsch* 3: 669-680.

Darlison MG, Greten FR, Harvey RJ, Kreienkamp HJ, Stühmer T, Zwiers H, Lederis K, Richter D. 1997. Opioid receptors from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): Sequence, pharmacology, coupling to a G-protein-gated inward- rectifying potassium channel (GIRK1), and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8214-19.

Denavit-Saubié M, Champagnat J, Zieglgänsberger W. 1978. Effects of opiates and methionine-enkephalin on pontine and bulbar respiratory neurones of the cat. *Brain Res* 155:55-67.

Dickenson AH, Fardin V, Le Bars D, Besson JM. 1979. Antinociceptive action following microinjection of methionine-enkephalin in the nucleus raphe magnus of the rat. *Neurosci Lett*. 15: 265-270.

Dores RM, McDonald LK, Crim JW. 1989. Detection of met-enkephalin and leu-enkephalin in the posterior pituitary of the holosteom fish, *Amia calva*. *Peptides* 10: 951-56.

Dores RM, Lecaude S, Bauer D, Danielson PB. 2002. Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass Spectrom Rev* 21: 220-243.

Dreborg S, Sundström G, Larsson TA, Larhammar D. 2008. Evolution of vertebrate opioid receptors. *PNAS* 105: 15487-15492.

Echteler SM. 1984. Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol* 230: 536-551.

Erbs E, Faget L, Scherrer G, Kessler P, Hentsch D, Vonesch JL, Matifas A, Kieffer BL, Massotte D. 2012. Distribution of delta opioid receptor- expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 221: 203-213.

Erbs E, Faget L, Scherrer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch JL, Koch M, Kessler P, Hentsch D, Birling MC, Koutsourakis M, Vasseur L, Veinante P, Kieffer BL, Massotte D. 2014. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* 220: 677-702.

Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952- 1955.

Feldman JL, Del Negro CA. 2006. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7: 232-242.

Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y. 2012. Current research on opioid receptor function. *Curr Drug Targets* 13: 230-246.

Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. 2000. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25: 195-200.

Finger TE. 1983. The gustatory system in teleost fish. Northcutt RG, Davis RE (EDS) *Fish neurobiology 1. Brainstem and sense organs* university of Michigan press. Ann Arbor p: 285-309.

Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004a. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I: Olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol* 480: 180-203.

Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004b. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) II: Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480: 204-233.

Folgueria M, Anadón R, Yáñez J. 2005. Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res Bull* 66: 361-364.

Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2006. Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A tract-tracing study. *J Comp Neurol* 497: 542-565.

Folgueira M, Sueiro C, Rodríguez- Moldes I, Yáñez J, Anadón R. 2007. Organization of the torus longitudinalis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J Comp Neurol* 503: 348-370.

Folgueira M, Bayley P, Navratilova P, Becker TS, Wilson SW, Clarke JDW. 2012. Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Develop* 7: 32.

Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H. 1993. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ and μ -Subtypes. *FEBS Lett* 327: 311-314.

Fuller CL, Byrd CA. 2005. Ruffer cells identified in the adult zebrafish olfactory bulb. *Neurosci Lett* 379: 190-194.

Gabilondo AM, Meana JJ, García-Sevilla JA. 1995. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. *Brain Res* 68: 245-250.

GaveriauxG-avériaux-Ruff C, Kieffer BL. 2011. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 22 :405-414.

Gayoso JA, Castro A, Anadón R, Manso MJ. 2011. Differential bulbar and extrabulbar projections of diverse olfactory receptor neurons populations in the adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 519: 247-276.

George F, Normand E, Bloch B, Le Moine C. 1998. Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res* 109: 187-199.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 6666-6670.

González-Núñez V, González Sarmiento R, Rodríguez RE. 2003a. Characterization of zebrafish opioid proenkephalin reveals novel opioid sequences. Brain Res Mol Brain Res 114: 31-39.

González-Núñez V, González Sarmiento R, Rodríguez RE. 2003b. Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociception sequences in the same precursor. Biochim Biophys Acta 1629: 114-118.

González-Núñez V, González Sarmiento R, Rodríguez RE. 2003c. Identification to two proopiomelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). Brain Res Mol Brain Res 120: 1-8.

González-Núñez V, Barrallo A, Traynor JR, Rodríguez RE. 2006. Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. J Pharmacol Exp Ther 316: 900-904.

González-Núñez V, Marron Fernandez de Velasco E, Arsequell G, Valencia G, Rodríguez RE. 2007. Identification of dynorphin A from zebrafish: A comparative study with mammalian dynorphin A. Neuroscience 144: 675-684.

González-Núñez V, Toth G, Rodríguez RE. 2007. Endogenous heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. Peptides 28: 2340-2347.

Granier S, Manglik A, Kruse A, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK. 2012. Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485: 400-404.

Gubler U, Seeburg P, Hoffman BJ, Gage LP, Udenfriend S. 1982. Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295: 206-208.

Gulya K. 1990. The opioid system in neurologic and psychiatric disorders and in their experimental models. *Pharmacol Ther* 46: 395-428.

Haji A, Takeda R. 2001. Effects of a kappa-receptor agonist U-50488 on bulbar respiratory neurons and its antagonistic action against the mu receptor-induced respiratory depression in decerebrate cats. *Jpn J Pharmacol* 87: 333-337.

Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. 1998. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopestics. *Peptides* 19: 1603-1630.

Herrick CJ. 1948. The brain of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. The university of Chicago press. Chicago Illinois.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-580.

Janecka A, Fichna J, Janecki .T. 2004. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem* 4: 1-17.

Jensen TS, Yaksh TL. 1986. Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique. *Brain Res* 372: 301-312.

Jesuthasan S. 2011. Fear, Anxiety, and Control in the zebrafish. *Dev Neurobiol* 72 :395-403.

Källén E. 1950. A contribution to the embryogenetic development of the nuclei in the forebrain in *Lepisosteus*. *Acta Anat (Basel)* 9: 297-308.

Kaslin J, Panula P. 2001. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 440: 457-477.

Kavaliers M. 1982. Pineal mediation of the thermoregulatory and behavioral activating effects of beta-endorphin. *Peptides* 3: 679-85.

Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. 1992. The δ -opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12048-12052.

King JA, Millar RP. 1980. Radioimmunoassay of methionine (5)-enkephalin sulphoxide: Phylogenetic and anatomical distribution. *Peptides* 1: 211-216.

Klemm W. 2004. Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med Sci Monit* 10: RA261-273.

Knapp RJ, Malatynska E, Collins N, Fang L, Wang JY. 1994. Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *Faseb J* 9: 516-525.

Kotrschal K, Van Staaden MJ, Huber R. 1998. Fish brain: evolution and environmental relationships. *Reviews in fish biology and fisheries*. 8: 373-408.

Kuan YS, Yu HH, Moens CB, Halpern ME. 2007. Neuropilin asymmetry mediates a left-right difference in habenular connectivity. *Development* 134: 857-865.

Lalley PM. 2003. Mu-opioid receptor agonist effects on medullary respiratory neurons in the cat: evidence for involvement in certain types of ventilatory disturbances. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: 1287-1304.

Levy RA, Proudfit KH. 1979. Analgesia produced by microinjection of baclofen and morphine at brain stem sites. *Eur J Pharmacol* 57:43-55.

Li X, Keith Jr DE, Evans CJ. 1996a. Multiple opioid receptor-like genes are identified in diverse vertebrate phyla. *FEBS Letters* 397: 25-29.

Li X, Keith Jr DE, Evans CJ. 1996b. Mu opioid receptor-like sequences are present throughout vertebrate evolution. *J Mol Endocrinol* 37: 391-403.

Lillesaar C. 2011. The serotonergic system in fish. *J Chem Neuroanat* 41: 294-308.

Lonergan T, Goodchild AK, Christie MJ, Pilowsky PM. 2003. Mu opioid receptors in rat ventral medulla: effects of endomorphin-1 on phrenic nerve activity. *Respir Physiol Neurobiol* 138: 165-178.

Lutz PE, Kieffer BL. 2012. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* 36: 195-206.

Ma PM. 1994 a. Catecholaminergic systems in the zebrafish I. Number, morphology, and histochemical characteristics of neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 344: 242-255.

Ma PM. 1994 b. Catecholaminergic systems in the zebrafish II. Projection pathways and pattern of termination of locus coeruleus. *J Comp Neurol* 344: 256-269.

Macho Sanchez- Simon F, Rodriguez RE. 2008. Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* 151:129-37.

Mansour A, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. 1993. Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Comp Neurol* 344: 351-362.

Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350: 412-438.

Mansour A, Watson SJ, Akil H. 1995. Opioid receptors: past, present and future. *Trends Neurosci* 18: 69-70

Mansour-Robaey S, Pinganaud G. 1990. Quantitative and morphological study of cell proliferation during morphogenesis in the trout visual system. *J Comp Neurol* 31:495- 504.

Marrón Fdez de Velasco E, Law PY, Rodríguez RE. 2009. Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish* 6: 259-268.

Martín I, Gomez A, Salas C, Puerto A, Rodríguez F. 2011. Dorsomedial pallium lesions impair taste aversion learning in goldfish. *Neurobiol Learn Mem* 96: 297-305.

McCormick CA, Hernandez DV. 1996. Connection of the octaval and lateral line nuclei of the medulla in the goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in goldfish and catfish. *Brain Behav Evol* 47: 113-137.

McDonald LK, Dores RM. 1991. Detection of met-enkephalin in the CNS of the teleost, *Anguilla rostrata* and *Oncorhynchus kisutch*. *Peptides* 12: 541-547.

McDonald LK, Joss JM, Dores RM. 1991. The phylogeny of met-enkephalin and leu-enkephalin: studies on the holostean fish *Lepisosteus platyrhincus* and the *Australian lungfish neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol* 84: 228-236.

McFadyen IJ, Metzger TG, Paterlini MG, Ferguson DM. 2001. Exploring the unique pharmacology of a novel opioid receptor, ZFOR1, using molecular modeling and the “ Message-address” concept. *Protein Engineering* 12: 953-960.

Meek J, Nieuwenhuys R. 1998. Holosteans and Teleost. In : Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. *The central nervous system of vertebrates*. Berlin: Springer. P 759-937.

Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watson SJ, Akil H. 1993. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9954-9958.

Merrill JL, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL. 2009. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89: 1379-1412.

Metscher BD, Ahlerbg PE. 1999. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Dev Biol* 210: 1-14.

Mika J, Przewlocki R, Przewolcka B. 2001. The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur j Pharmacol* 415: 31- 27

Milan-Lobo L, Enquist J, Van Rijn RM, Whistler JL. 2013. Anti-Analgesic effect of the Mu/Delta opioid receptor heteromer revealed by ligand-biased antagonism. *PLoS ONE* 8: e58362.

Millan MJ. 1986. Multiple opioid systems and pain. *Pain* 27: 303-347.

Millhorn DE, Hökfelt, Verhofstad AA, Terenius L. 1989. Individual cells in the raphe nuclei of the medulla oblongata in rat that contain immunoreactivities for both serotonin and enkephalin project to the spinal cord. *Exp Brain Res* 75: 536-542.

Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa S, Onogi T. 1995. Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 329: 291-295.

Miyamura Y, Nakayasu H. 2001. Zonal distribution of Purkinje cells in the zebrafish cerebellum: analysis by means of a specific monoclonal antibody. *Cell Tissue Res* 305: 299-305.

Molliver ME. 1987. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol* 7: 3S-23S.

Morin-Surun MP, Boudinot E, Gacel G, Champagnat J, Roques BP, Denavit-Saubie M. 1984. Different effects of mu and delta opiate agonist on respiration. *Eur J Pharmacol* 98: 235-240.

Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ. 2004. Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Devolp Brain Res* 148: 213-222.

Mueller T, Wullimann MF. 2002b. BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies show unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. *Mech Dev* 117: 123-135.

Mueller T, Dong Z, Berberoglu MA, Guo S. 2011. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Res* 1381: 95-105.

Mutolo D, Bongianini F, Einum J, Dubuc R, Pantaleo T. 2007. Opioid- induced depression in the lamprey respiratory network. *Neuroscience* 15: 720-729.

Nakamura K. 2013. The role of the dorsal raphe nucleus in reward-seeking behaviour. *Front Integr Neurosci* 27: 7:60.

Narita m., Kuzumaki N., Miyatake M., Sato F., Wachi H., Seyama Y., Suzuki T. 2006. Role of δ -opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem* 97: 1494-1505.

Nelson J. 2006. *Fishes of the world*. Fourth edition.

Nieuwenhuys R. 1959. The structure of the telencephalon of the teleost *Gasterosteus aculeatus*. K Ned Akad Wet Proc ser C 62: 341-62.

Nieuwenhuys R, Pouwells E. 1983. The brain stem of actinopterygian fishes. In: Northcutt RG, Davis RE (eds): Fish Neurobiology, Vol. 1 Brain Stem and Sense Organs. Ann Arbor: University of Michigan Press, pp. 25-87.

Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. 1988. The human central nervous system: A synopsis and atlas. 3rd edition, Berlin: Springer Verlag.

Nitsche JF, Pintar JE. 2003. Opioid receptor- induced GTP γ ³⁵ S Binding during Mouse Development. Develop Biology 253: 99-108.

Noda M, Furutani Y, Takehashi H, Toyosato M, Hirosine T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature 295: 202-6.

Northcutt RG. 1983. Evolution of the optic tectum in ray-finned fishes. In: Davis RE.

Northcutt RG, Wullimann MF. 1988. The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In: Atema J., Fay R.R. Popper A. N. Tavolga W. N. (eds): Sensory Biology of Aquatic Animals. New York: Springer Verlag, pp: 515-552.

Palmgren A. 1921. Embryological and morphological studies on the midbrain and cerebellum of vertebrates. Acta Zool 2:1-94.

Pasternak GW. 1993. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. Clin Neuropharmacol 16: 1-18.

Peckys D, Landwerhrmeyer GB. 1999. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. Neuroscience 88: 1093-1135.

Peng J, Sarkara S, Chang S. 2012. Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. Drug Alcohol Depend. 124: 223-228.

Pert CB, Snyder SH. 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science 179: 1011-1014.

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvett M, Luppi PH. 1998. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. Neuroscience 82: 443-468.

Pimpinelli F, Parenti M, Guzzi F, Piva F, Hokfelt T, Maggi R. 2006. Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. Brain Res 1070: 15-23.

Pinal-Seoane N, Martin IR, González-Núñez V, Marrón Fdez de Velasco E, Álvarez FA, Sarmiento RG, Rodríguez RE. 2006. Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. J Mol Endocrinol 37: 391-403.

Pinganaud G. 1980. Development of the trout visual system (*Salmo irideus*) (author's transl). Arch Anat Microsc Morphol Exp 69: 215-31.

Plytycz B. 1974. The rejection of skin allografts in three populations of *Triturus vulgaris* (L). *Folia Biol* (Krakow) 22: 405-414.

Porteros A, García- Isidoro M, Barrallo A, González-Sarmiento R, Rodríguez R. E. 1999. Expression of ZFOR1, a δ - Opioid receptor, in the Central Nervous System of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 412: 429-438.

Pouwells E. 1978. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdnei*. I Patterns of cell migration. *Anat Embryol* (Berj) 152: 291-308.

Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. 2011. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol* 32: 581-590.

Pradhan AA, Smith ML, Kieffer BL, Evans CJ. 2012. Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *Br J Pharmacol*. 167: 960-969.

Prasada Rao PD, Jadhao AG, Sharma SC. 1987. Descending projection neurons to the spinal cord of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 235: 96-108.

Proteau- Gagné A, Bournival V, Rochon K, Dory YL, Gendron L. 2010. Exploring the backbone of enkephalins to adjust their pharmacological profile for the δ opioid receptor. *ACS Chem Neurosci* 1: 757-769.

Przewlocki R, Przewlocka B. 2005. Opioids in neuropathic pain. *Curr Pharm Des* 11: 3013-3025.

Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45: 330-334.

Rink E, Wullimann MF. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889: 316-330.

Rink E, Wullimann MF. 2002b. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of a ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull* 57: 385-387.

Rink E, Wullimann MF. 2004. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011: 206-220.

Robles Y, Vivas-Mejia PE, Ortiz-Zuazaga HG, Félix J, Ramos X, Pena de Ortiz S. 2003. Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem* 80: 80-95.

Rodríguez RE, Barrallo A, García-Malvar F, Mcfayden IJ, Gonzalez- Sarmiento R, Traynor JR. 2000. Characterization of ZFOR1, a putative delta- opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Letters* 288: 207-210.

Rojas-Muñoz A, Bernad Maina A, Izpisúa Belmonte JC. 2007. El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia*.

Ronker E, Mulder AH, Schoffelmeer AN. 1993. Interacting presynaptic kappa-opioid and GABAA receptors modulate dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem.* 61:1634-1649.

Rossi GC, Su W, Leventhal L, Su H, Pasternak GW. 1997. Antisense mapping DOR-1 in mice: further support for δ receptor subtypes. *Brain Res* 753: 176-179.

Rouveix B. 1992. Opiates and immune function. Consequences on infectious diseases with special reference to AIDS. *Therapie* 47: 503-512.

Sharp BM, Li MD, Matta SG, McAllen K, Shahabi Na. 2000. Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells. *Ann N Y Acad Sci* 917: 764-770.

Sibinga NE, Goldstein A. 1988. Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu Rev Immunol* 6: 219-249.

Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:1947-1949.

Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Matthes H, Nappey V, Lannes B, Micheletti G, Kieffer B. 1994. The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* 46:1015-1021.

Singh R., Rai U. 2009. Delta opioid receptor-mediated immunoregulatory role of methionine- enkephalin in freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch.). *Peptides* 30: 1158-1164.

Smith JS, Zubietta JK, Price JC, Flesher JH, Madar I, Lever JR, Kinter CM, Dannals RF, Frost J. 1999. Quantification of δ - opioid receptor in human brain with N1'- ([¹¹ C] Methyl) Naltrindole and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 956-966.

Sneddon LU. 2004. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 123-130. Somvanshi RK, Kumar U. 2014. δ -opioid receptor and somatostatin receptor- 4 heterodimerization: possible implications in modulation of pain associated signaling. *PLoS ONE* 9: e85193.

Staples M, Acosta S, Tajiri N, Pabon M, Kaneki Y, Borlongan CV. 2013. Delta opioid receptor and its peptide: a receptor-ligand neuroprotection. *Int J Mol Sci.* 14: 17410-17419.

Stevens CW. 2004. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Research Reviews* 46: 204-215.

Svingos AL, Cheng PY, Clarke CL, Pickel VM. 1995. Ultrastructural localization of δ - opioid receptor and Met⁵-enkephalin immunoreactivity in rat insular cortex. *Brain Res* 700: 25-39.

Terenius L. 1973. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 32: 317-320.

Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. 1993. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 11: 903-913.

Varga R, Jóhannesdóttir IP, Sigurgeirsson B, Þorsteinsson H, Karlsson KÆ. 2011. The zebrafish brain in research and teaching: a simple in vivo and in vitro model for the study of spontaneous neural activity. *Adv Physiol Educ* 35: 188-196.

Vecino E, Perez MT, Ekström P. 1995. Localization of enkephalinergic neurons in the central nervous system of the salmon (*Salmo salar* L.) by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 9: 81-97.

Villani L, Dipietrangelo L, Pallotti C, Pettazzoni P, Zironi L, Guarnieri T. 1994. Ultrastructural and immunohistochemical study of the telencephalon-habenulo-interpeduncular connections of the goldfish. *Brain Res Bull* 34: 1-15.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. 2004. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73: 953-990.

Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. 1994. μ opiate receptor :cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10230-10234.

Wood OW, Iyengar S, Pasternak GW. Central actions of opiates and opioid peptides. In: Pasternak, GW: ed. The opiate receptors. Clifton, NJ: Humana Press 1988: 307-356.

Wang QP, Nakai Y. 1994. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull* 34:575-85.

Wullimann M, Northcutt RG. 1988. Connections of the corpus cerebella in the green sunfish and the common goldfish: A comparison of perciform and cypriniform teleost. *Brain Behav Evol* 32: 293-316.

Wullimann MF, Northcutt RG. 1989. Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleost, the common goldfish: a comparison of peciform and cyrpiniiform teleost. *Brain Behav Evol* 32: 293- 316.

Wullimann MF, Meyer DL. 1990. Phylogeny of putative cholinergic visual pathways through the pretectum to the hypothalamus in teleost fish. *Brain Behav Evol* 36: 14-29.

Wullimann MF, Northcut RG. 1990. Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: and evolutionary perspective. *J Comp Neurol* 297: 537-52.

Wulliman MF, Hofmann MH, Meyer DL. 1991a. The valvula cerebelli of the spiny ell, *Macrognathus aculeatus*, receives primary lateral-line afferents from the rostrum of the upper jaw. *Cell Tiss Res* 266: 285-93.

Wullimann MF, Meyer DL, Northcutt RG. 1991b. The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleost *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol* 312: 415-35.

Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas.

Wullimann MF, Mueller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol* 475: 143-162.

Wullimann MF. 2009. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. *Integr Zool* 4: 123-133.

Xue HG, Yamamoto H, Yang CY, Kerem G, Yoshimoto M, Sawai N, Ito H, Ozawa H. 2006. Projections of sensory nucleus in a percomorph teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Comp Neurol* 495: 279-298.

Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. 1993. Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6736-6740.

Yeadon M, Kitchen I. 1989. Opioids and respiration. *Prog Neurobiol* 33: 1-16

